

Univerzita Karlova v Praze

1. lékařská fakulta

Doktorský studijní program v biomedicině

Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie, genetika a virologie



Monika Belíčková

**MYELOYDYSPLASTICKÝ SYNDROM – HLEDÁNÍ
MOLEKULÁRNÍ PODSTATY**

**MYELOYDYSPLASTIC SYNDROMES – SEARCH FOR THE
MOLECULAR BASIS**

Disertační práce

Školitel: Doc. MUDr. Jaroslav Čermák, CSc.

Praha, 2017

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem dizertační práci zpracovala samostatně, a že jsem řádně uvedla a citovala všechny použité prameny a literaturu. Současně prohlašuji, že práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.

Souhlasím s trvalým uložením elektronické verze mé práce v databázi systému meziuniverzitního projektu Theses.cz za účelem soustavné kontroly podobnosti kvalifikačních prací.

V Praze, 28. 6. 2017

Mgr. Monika Belíčková

Identifikační záznam:

BELIČKOVÁ, Monika. *Myelodysplastický syndrom – hledání molekulární podstaty*.
[*Myelodysplastic syndromes – search for the molecular basis*]. Praha, 2017. 88 s. Dizertační práce (Ph.D). Univerzita Karlova v Praze, 1. lékařská fakulta, Ústav hematologie a krevní transfuze. Školitel: Doc. MUDr. Jaroslav Čermák, CSc.

Poděkování:

Děkuji svému školiteli, Doc. MUDr. Jaroslavu Čermákovi, CSc. za odborné vedení, cenné rady, spolupráci a za veškerou podporu po celou dobu doktorského studia.

Dále velice děkuji všem spolupracovníkům Oddělení genomiky z Ústavu hematologie a krevní transfuze (ÚHKT), zejména RNDr. Haně Votavové Ph.D, Mgr. Jitce Veselé a Ing. Michaelae Dostálové Merkerové Ph.D.

Rovněž bych chtěla poděkovat ostatním pracovníkům z ÚHKT jmenovitě MUDr. Daně Mikulenkové, RNDr. Janě Březinové, Ph.D. a Prof. Ing. Kyře Michalové, DrSc. Dále lékařům Klinického úseku ÚHKT za poskytnutí klinických údajů a samozřejmě všem pacientům za jejich souhlas se zpracováním vzorků na vědecké účely, bez kterých by nemohly proběhnout žádné analýzy.

Dále velice děkuji všem kolegům a kolegyním z I. interní kliniky Všeobecné fakultní nemocnice a Ústavu patologické fyziologie 1. lékařské fakulty. Jmenovitě bych ráda poděkovala: MUDr. Anně Jonášové Ph.D., Prof. MUDr. Marku Trněnému, CSc, Doc. RNDr. Zuzana Zemanové CSc. a Prof. MUDr. Tomáši Stopkovi, Ph.D.

Prof. MUDr. Petru Cetkovskému, Ph.D., MBA děkuji za možnost pracovat na Oddělení genomiky ÚHKT.

V neposlední řadě moje velké díky patří mé rodině za pochopení a trvalou podporu.

Prohlášení	2
Identifikační záznam	3
Poděkování	4
Obsah	5
Seznam použitých zkratk	7
 ABSTRAKT: česká verze	 9
ABSTRAKT: anglická verze	11
 1. ÚVOD	 13
 2. CÍLE PRÁCE A HYPOTÉZY	 14
 3. LITERÁRNÍ PŘEHLED PROBLEMATIKY	
3.1 Myelodysplastický syndrom	15
3.2 Etiologie	15
3.3 Incidence	15
3.4 Klinické projevy	16
3.5 Diagnostika	16
3.6 Klasifikace	17
3.7 Léčba	22
3.8 Patogeneze	22
3.8.1 Cytogenetika	24
3.8.2 Mutace	26
3.9 Úvod k jednotlivým řešeným tématům	
3.9.1 Úvod k problematice mutací v genu <i>TP53</i>	30
3.9.2 Úvod k problematice hypometylační léčby	30
3.9.3 Úvod k problematice bodových polymorfismů	31
 4. KLINICKÉ SOUBORY, METODY A VÝSLEDKY	
4.1 Mutace v genu <i>TP53</i>	
4.1.1 Klinický soubor	33
4.1.2 Metody	35
4.1.3 Výsledky	36
4.2 Predikce odpovědi na hypometylační léčbu	
4.2.1 Klinický soubor	51
4.2.2 Metody	52
4.2.3 Výsledky	53
4.3 Identifikace bodových polymorfismů asociovaných s MDS	
4.3.1 Klinický soubor	61
4.3.2 Metody	62
4.3.3 Výsledky	64
 5. DISKUZE A ZÁVĚRY	
5.1 Diskuze a závěry k tématu - Mutace v genu <i>TP53</i>	68

5.2	Diskuze a závěry k tématu - Predikce léčebné odpovědi na hypometylační činidla	70
5.3	Diskuze a závěry k tématu - Identifikace bodových polymorfismů asociovaných s MDS	73
6.	SOUHRN	75
	LITERATURA	77
	PUBLIKACE AUTORA K TÉMATU DISERTACE	86

Seznam použitých zkratk:

AML	Akutní myeloidní leukemie
AML s MRC	AML se změnami souvisejícími s myelodysplázií
AZA	Azacitidin
CCUS	Klonální cytopenie neurčitého významu idiopatickou
CDR	Běžně deletované regiony
CI	Interval spolehlivosti
CMML	Chronická myelomonocytární leukemie
CR	Kompletní remise
FAB	Francouzsko-americko-britský systém
HI	Hematologické zlepšení
HR	Hazard ratio
CHIP	Klonální hematopéza neurčitého potenciálu
ICUS	Idiopatickou cytopenie neurčitého významu
IDUS	Idiopatická dysplázie neurčitého významu
IPSS	Mezinárodní skórovací systém prognózy
IPSS-R	Revidovaný mezinárodní skórovací systém prognózy
IPSS-Rm	Revidovaný molekulární mezinárodní skórovací systém prognózy
KD	Kostní dřeň
mCR	Kompletní remise ve dřeni
MDS	Myelodysplastický syndrom
MPN	Myeloproliferativní neoplázie
NGS	Sekvenování nové generace
OR	Odds ratio
OS	Celkové přežití
PD	Progrese nemoci
PFS	Doba přežití bez progrese
PK	Periferní krev
PR	Parciální remise
RAEB 2	Refrakterní anémie s přebytkem blastů 2
RAEB-1	Refrakterní anémie s přebytkem blastů 1
RARS	Refrakterní anémie s prstenčitými sideroblasty

RCMD	Refrakterní cytopenie s multilineární dysplázií
RCMD-RS	RCMD s prstenčitými sideroblasty
SD	Stabilní onemocnění
SNPs	Jednonukleotidové polymorfismy
VAF	Variantní alelická frekvence
WHO	Světová zdravotnická organizace
WPSS	Bodovací systém prognózy na bázi WHO-klasifikace

ABSTRAKT:

Klíčová slova: Myelodysplastický syndrom; mutace v genu *TP53*; hypometylační léčba; asociační studie; jednonukleotidové polymorfismy

Myelodysplastický syndrom (MDS) je heterogenní skupina klonálních hematopoietických onemocnění s neefektivní hematopoézou. Je charakterizován morfologickou dysplázií, periferní cytopenií postihující jednu či více vývojových buněčných linií a zvýšeným rizikem transformace do akutní myeloidní leukemie (AML). Časné fáze MDS se dají považovat za premaligní onemocnění. Patogeneze MDS nebyla doposud dostatečně vysvětlena, ale s rozvojem molekulárně genetických a cytogenetických metod dochází postupně k objasňování vzniku a vývoje choroby.

Vedle cytogenetických změn, které jsou součástí používaného prognostického systému (IPSS-R), se do popředí dostávají také somatické mutace nacházející se v různých genech. V klinické praxi však nejsou zatím rutinně používány. Jeden z cílů této práce bylo sledování mutací v genu *TP53* u pacientů s nízkým rizikem MDS, kteří mají obecně dobrou prognózu a u kterých tato zjištění mají zvláště relevantní prognostický význam. Vyšetřili jsme celkem 154 pacientů s nízkým rizikem MDS a u 13% z nich jsme detekovali mutaci. Po rozdělení pacientů podle přítomnosti del(5q) jsme zjistili signifikantní rozdíly v zastoupení mutací. U 23,6% pacientů s delecí byla zachycena mutace na rozdíl od 3,8% pacientů bez delecce. Multivariantní analýzou jsme zjistili, že mutace v genu *TP53* (HR 3,7) je nejsilnější prognostický faktor pro celkové přežití (OS), tak i pro přežití bez progresu (PFS). Dále jsme zjistili, že malé *TP53*-mutované subklony nemají stejný nepříznivý prognostický dopad na OS a PFS u pacientů s nižším rizikem MDS, tak jako klony s vysokou mutační zátěží. Byla zjištěna korelace ve velikosti mutovaného klonu mezi buňkami izolovanými z periferní krve a kostní dřeně. Na základě zjištěných výsledků se domníváme, že by mělo být určování mutací v genu *TP53* u pacientů s nízkým rizikem MDS prováděno rutinně v době stanovení diagnózy, v průběhu choroby, a před zahájením léčby.

Hypometylační terapie pomocí azacitidinu (AZA) se v současné době používá v léčbě pacientů s pokročilými formami MDS, kteří nejsou indikováni k transplantaci krvetvorných buněk. Na léčbu AZA pozitivně reaguje pouze polovina pacientů a klinický stav pacientů po selhání léčby AZA je velmi špatný. Proto jsme se zaměřili na identifikaci markerů, které by mohly predikovat léčebnou odpověď na AZA. Identifikovali jsme zvýšenou expresi několika ribozomálních genů u pacientů bez odpovědi před zahájením léčby AZA, což pravděpodobně odráželo intenzivní proteosyntézu v proliferativních/neoplastických buňkách. Předpokládáme,

že selhání léčby je výsledkem vysoké míry proliferace a pokročilého stavu onemocnění, který nelze hypometylační léčbou již zvrátit.

Jednonukleotidové polymorfismy (SNPs) v sekvenci DNA jsou nejvíce rozšířené polymorfismy v genomu člověka a mohou sloužit k odhalování genetických predispozic k onemocněním v rámci asociačních studií. Pokusili jsme se najít SNPs, které by s MDS souvisely ať již přímo nebo by byly ve vazebné nerovnováze se skutečnou kauzální alelou. Nalezli jsme devět bodových polymorfismů, které souvisely s MDS fenotypem. Z toho tři SNPs jsou lokalizovány v DNA reparačních genech (*LIG1*, *RAD52*, *MSH3*) a jeden SNP v genu, který chrání buňky před oxidačním poškozením (*GPX3*). Dále byly identifikovány dva SNPs (*ROS1*, *STK6*), jejichž genotyp byl asociován s celkovým přežitím pacientů. Domníváme se, že tyto geny by se mohly podílet na vzniku MDS.

Výsledky předkládané disertační práce poskytují další informace o molekulárním pozadí MDS a možných mechanismech vedoucích ke vzniku či progresi onemocnění a jsou také podkladem pro další studie zaměřené na aplikaci těchto nálezů do klinické praxe.

ABSTRACT:

Key words: Myelodysplastic syndrome; mutations in *TP53* gene; hypomethylation therapy; association study; single nucleotide polymorphisms

Myelodysplastic syndrome (MDS) is a heterogeneous group of clonal hematopoietic stem cell disorders with ineffective hematopoiesis. It is characterized by morphological dysplasia, peripheral cytopenias affecting one or more cell lineages and an increased risk of transformation into acute myeloid leukemia (AML). The early stages of MDS can be considered a premalignant disease. The pathogenesis of MDS has not been fully explained yet, but due to the development of molecular genetic and cytogenetic methods, the origin and development of the disease is gradually being elucidated.

In addition to the cytogenetic changes that are part of the prognostic system (IPSS-R), the somatic mutations found in different genes come to the forefront of interest. However, they are not routinely used in clinical practice. One of the objectives of this study was monitoring of mutations in *TP53* gene in lower-risk MDS patients who generally have a good prognosis and for whom these findings have a particularly relevant prognostic significance. We investigated a total of 154 patients with lower-risk MDS, and 13% of them had a mutation. After dividing patients according to the presence of del(5q), we observed significant differences in the incidence of the mutations. The mutations were detected in 23.6% of patients with deletion compared to 3.8% of patients without deletion. Using multivariate analysis, we determined that the mutation in *TP53* gene (HR 3.7) is the strongest prognostic factor for both overall survival (OS) and progression-free survival (PFS). We also found that small *TP53*-mutated subclones did not have the same unfavorable prognostic impact on OS and PFS in patients with low-risk MDS as the clones with high mutational burden. A high correlation in the size of the mutated clone was found between cells isolated from peripheral blood and bone marrow. Based on these findings, we assume that the *TP53* mutations should be routinely detected at the time of diagnosis, during the course of the disease, and prior to initiation of treatment, in patients with lower-risk MDS.

Azacitidine (AZA) hypomethylation therapy is currently used for the treatment of patients with advanced stages of MDS who are not indicated for hematopoietic stem cell transplantation. Approximately only half of the patients respond positively to the AZA therapy and the clinical patient outcome after AZA treatment failure is very poor. Therefore, we focused on the identification of markers that could predict the response to AZA therapy. We detected an increased expression of several ribosomal genes in non-responsive patients

before AZA treatment that likely reflected an intensive proteosynthesis in proliferative/neoplastic cells. We suppose that a possible treatment failure results from a high rate of proliferation and advanced state of the disease cannot be reversed by demethylation treatment.

Single-nucleotide polymorphisms (SNPs) in the DNA sequence are the most common polymorphisms in the human genome, and can serve to detect genetic predispositions to disease in association studies. We attempted to identify SNPs that could be related to MDS either directly or were in linkage disequilibrium with the actual causal allele. We found nine point polymorphisms that were associated with MDS phenotype. Of these, three SNPs are located in DNA repair genes (*LIG1*, *RAD52*, and *MSH3*) and one in the gene protecting the cells from oxidative damage (*GPX3*). In addition, two SNPs (*ROS1*, *STK6*), whose genotype was associated with overall survival of the patients, were identified. We hypothesize that these genes may be involved in the pathogenesis of MDS.

The results of the presented dissertation provide further information on the molecular background of MDS and possible mechanisms leading to the onset or progression of the disease and also represent the basis for further studies aimed at applying these findings to clinical practice.

1. ÚVOD

S termínem myelodysplastický syndrom (MDS) se prvně setkáme v roce 1976, kdy francouzsko-americko-britská (FAB) kooperativní skupina pro klasifikaci leukemií, definovala dvě kategorie pro „dysmyelopoietické syndromy“, refrakterní anémie s nadbytkem blastů (RAEB) a chronickou myelomonocytární leukemii (CMML) (Bennett JM et al., 1976). Jedním ze sedmi zakládajících členů FAB skupiny byl prof. John M. Bennett, který se MDS aktivně věnuje doposud. Později, v roce 1982, FAB skupina odborníků vytvořila nové, podrobnější dělení MDS, které se podobá dnešnímu (Bennett JM et al., 1982).

Do ustanovení termínu MDS se používal název preleukemie, doutnající či oligoblastická leukemie. Tyto názvy byly spojeny s rizikem onemocnění, a to přechodem MDS v akutní leukemii. Nicméně, časem se ukázalo, že větší část nemocných do stádia leukemie nikdy nedospěje. Nový název v sobě zahrnuje základní charakteristiku onemocnění, morfológickou dysplázií krvetvorných buněk, která se projeví selháním funkce kostní dřeně.

MDS spolu s leukémiemi, myeloproliferativními chorobami, lymfomy a mnohočetným myelomem patří mezi tzv. hematologická onemocnění, tedy mezi nádorové onemocnění krve a krvetvorných orgánů.

Patogeneze MDS nebyla doposud dostatečně vysvětlena, ale s rozvojem molekulárně genetických a cytogenetických metod dochází postupně k objasňování vzniku a vývoje choroby.

2. CÍLE PRÁCE A HYPOTÉZY

Cílem předkládané disertační práce bylo s využitím moderních technologií molekulární genetiky zkoumat procesy podílející se na vzniku a rozvoji MDS.

Specifické cíle a hypotézy:

Hypotéza č. I.: U pacientů s MDS s nízkým rizikem se vyskytují mutace v genu *TP53* a mají zásadní vliv na průběh nemoci.

Cíle I.: Mutace v genu *TP53*

- a) Zjistit incidenci mutací v genu *TP53* u MDS s nízkým rizikem.
- b) Zjistit vliv mutace na přežití pacientů.
- c) Určit velikost mutační zátěže v jednotlivých typech buněk.

Hypotéza č. II.: Existuje určitý expresní vzorec genů, který by mohl predikovat odpověď hypometylační léčby.

Cíle II.: Predikce léčebné odpovědi na hypometylační činidla.

- a) Zjistit, zda expresní profil pacientů před léčbou odpovídá reakci na terapii.
- b) Zjistit změny genové exprese vyvolané léčbou.

Hypotéza č. III.: Existují polymorfismy, které jsou sdruženy s MDS.

Cíle III.: Identifikace bodových polymorfismů asociovaných s MDS.

3. LITERÁRNÍ PŘEHLED PROBLEMATIKY

3.1 Myelodysplastický syndrom

Myelodysplastický syndrom (MDS) je heterogenní skupina klonálních hematopoietických onemocnění s neefektivní hematopoézou. Je charakterizován morfologickou dysplázií a periferní cytopenií postihující jednu či více vývojových linií a zvýšeným rizikem transformace do akutní myeloidní leukemie (AML). Časně fáze MDS se dají považovat za premaligní (preleukemické) onemocnění (Nimer SD, 2008).

3.2 Etiologie

Většina případů, 80% až 90%, vzniká *de novo* a jejich etiologie je nejasná. Tento typ MDS označujeme jako primární. Zatímco 10% až 20% případů vzniká druhotně. Tento typ MDS nazýváme jako sekundární a vzniká po radioterapii nebo po chemoterapii (alkylačními cytostatiky či inhibitory topoizomerázy II) nebo za různě dlouhou dobu po expozici např. benzenu, insekticidům, pesticidům nebo organickým rozpouštědlům.

Kumulativní expozice životního prostředí, genetické rozdíly v leukemogenní citlivosti, stárnutí hematopoetických kmenových buněk a genomové stárnutí může přispět k patogenezi onemocnění u *de novo* případů (Bowen DT, 2013).

3.3 Incidence

Incidence MDS se přibližně pohybuje kolem 3-5 případů na 100 000 obyvatel za rok. U obyvatel nad 60 let je incidence 20 - 50 případů na 100 000 obyvatel za rok. Počet případů s diagnózou MDS stále narůstá s prodlužujícím se věkem populace a pravděpodobně se zvyšováním expozice k různým toxickým látkám. Celkový výskyt MDS je u mužů o něco vyšší než u žen (1,5 až 2:1), kromě subtypu MDS s del(5q), který se častěji vyskytuje u žen (Peter L et al., 2011). Průměrný věk pacienta je 65 let. Existuje i dětská forma MDS, která je velmi vzácná a tvoří pouze 4% případů diagnostikovaných hematonekologických onemocnění u dětí (Hasle H et al., 2003).

3.4 Klinické projevy

Hlavním znakem MDS jsou dysplastické změny v kostní dřeni (KD), to znamená porucha tvaru a funkčnosti krvinek. KD je většinou hypercelulární, ale může být i normo- nebo hypocelulární. Klinickým příznakem je pak cytopenie v periferní krvi (PK), která se může vyskytovat u všech tří buněčných linií. Přes 80-85% nemocných trpí anemií (hodnota hemoglobinu $<100\text{g/l}$), která se projeví bledostí, dušností, únavou a snížením fyzické výkonnosti. 40 % nemocných má snížený počet neutrofilních leukocytů (neutropenie), jež jsou určeny k imunitní obraně organismu. Proto pacienti trpí opakovanými bakteriálními či virovými infekcemi, například zápallem plic či močovou infekcí. U 30-45 % pacientů se vyskytuje trombocytopenie s projevy krvácení, které často postihují kůži ve formě krevních podlitin. Pacienti mohou mít i kombinaci několika výše popsaných cytopenií (mono-, bi- či pancytopenii). Ve většině případů pak vzniká buněčně bohatá kostní dřev v kontrastu se sníženým počtem krevních elementů v periferní krvi. Klinické projevy jsou však vysoce variabilní v závislosti na podtypu. Nemocní s MDS s vyšším rizikem a progresí onemocnění, kteří již mají zcela porušenou diferenciaci buněk a proliferaci nezralých blastických elementů ve dřev, mají vedle projevů cytopenií i obecné příznaky nádorových onemocnění. Klinické znaky MDS se překrývají s řadou jiných hematologických poruch, včetně akutní myeloidní leukemie, aplastické anémie, leukemie z velkých granulárních lymfocytů, myeloproliferativních poruch a paroxysmální noční hemoglobinurie (Barzi A and Sekeres MA, 2010; Hellstrom-Lindberg E, 2008; Steensma DP and Bennett JM 2006; Valent P et al., 2007; Foran JM et al., 2012).

3.5 Diagnostika

Diagnostická vyšetření se opírají o nálezy v periferní krvi a vyšetření kostní dřev. Vzorky kostní dřev mohou být získány při dvou odlišných procedurách – při sternální punkci nebo biopsií kostní dřev (trepanobiopsie). European LeukemiaNet v roce 2013 vydala seznam doporučených vyšetření pro určení diagnózy MDS, tabulka č. 1 (Malcovati L et al., 2013).

Vyšetření	Výsledek	Kategorie
Nátěr periferní krve	<ul style="list-style-type: none"> • hodnocení dysplazie v jedné nebo více bun. liniích • počet blastů 	Povinná
Sternální punkce	<ul style="list-style-type: none"> • hodnocení dysplazie v jedné nebo více bun. liniích • počet blastů • počet prstenčitých sideroblastů 	
Biopsie kostní dřeně	<ul style="list-style-type: none"> • posouzení buněčnosti • CD34 buněk • stupeň fibrózy 	
Cytogenetika	• detekce klonálních chromozomálních abnormalit	
FISH	• při selhání G-pruhování	Doporučená
Imunofenotypizace	• detekce abnormalit v jednotlivých buněčných liniích	
SNP array	• detekce chromozomálních aberací	Navrhovaná
Mutační analýza kandidátních genů	• detekce somatických mutací	

Tabulka č. 1: Doporučená vyšetření pro stanovení diagnózy MDS od European LeukemiaNet.

3.6 Klasifikace

Pro klasifikaci MDS syndromů bylo vytvořeno několik klasifikačních systémů, které jsou založeny hlavně na hodnocení počtu a typu cytopenií a procentu myeloblastů v kostní dřeni. První systém klasifikace byla tzv. FAB klasifikace z roku 1982, která rozděluje MDS do pěti subtypů zejména podle procentuálního zastoupení blastů v periferní krvi a kostní dřeni. Z této klasifikace vychází i novější klasifikační systém, WHO (World Health Organization) klasifikační systém z roku 1999 (Harris NL et al., 1999). Tento systém byl následně v roce 2008 a 2016 revidován (Swerdlow SH et al., 2008; Arber DA et al., 2016). V novém WHO klasifikačním systému byly nahrazeny názvy „refrakterní anémie“ a „refrakterní cytopenie“ termínem „myelodysplastický syndrom“, který je doplněn příslušným upřesněním. Tato klasifikace je uvedena v tabulce č. 2.

Celkem často se však vyskytují pacienti, kteří jsou obtížně zařaditelní do jednotlivých subtypů MDS dle WHO klasifikace. Například hypoplastická forma MDS má charakter

aplastické anémie (Barrett J et al., 2000), nebo některé formy mají spíše rysy myeloproliferativního onemocnění. Dle nové WHO klasifikace byla zavedena kategorie myelodysplastického syndromu (MDS) / myeloproliferativní neoplázie (MPN), která zahrnuje myeloidní novotvary s klinickými, laboratorními a morfologickými znaky, které se překrývají mezi MDS a MPN (Arber DA et al., 2016).

Název	Dysplastická linie	Cytope nie ^x	% prstenčitých sideroblastů v KD	% blastů v PK	% blastů v KD	Auerovy tyčky	Karyotyp
MDS s jednou dysplastickou linií (MDS-SLD)	1	1 - 2	<15 %/<5 %*	< 1 %	< 5 %	žádné	jakýkoliv, pokud nenaplní kritéria pro izolovanou del(5q)
MDS s multilineární dysplázií (MDS-MLD)	2- 3	1 - 3	<15 %/<5 %*	< 1 %	< 5 %	žádné	jakýkoliv, pokud nenaplní kritéria pro izolovanou del(5q)
MDS s prstenčitými sideroblasty (MDS-RS)							
MDS-RS s jednou dysplastickou linií (MDS-RS-SLD)	1	1 - 2	≥15 %/≥5 %*	< 1 %	< 5 %	žádné	jakýkoliv, pokud nenaplní kritéria pro izolovanou del(5q)
MDS-RS s multilineární dysplázií (MDS-RS-MLD)	2 - 3	1 - 3	≥15 %/≥5 %*	< 1 %	< 5 %	žádné	jakýkoliv, pokud nenaplní kritéria pro izolovanou del(5q)
MDS s izolovanou del(5q)	1 - 3	1 - 2	žádné nebo jakýkoliv	< 1 %	< 5 %	žádné	izolovaná del(5q) nebo s přidanou jednou abnormalitou mimo -7 nebo del(7q)
MDS s nadbytkem blastů (MDS-EB)							
MDS-EB-1	0 - 3	1 - 3	žádné nebo jakýkoliv	2 – 4 %	5 – 9 %	žádné	jakýkoliv
MDS-EB-2	0 - 3	1 - 3	žádné nebo jakýkoliv	5 – 19 %	10 – 19 %	ano	jakýkoliv
MDS, neklasifikovaný (MDS-U)							

s 1 % blastů v periferní krvi	1 - 3	1 - 3	žádné nebo jakýkoliv	1 %	< 5 % [§]	žádné	jakýkoliv
s jednou dysplastickou linií a pancytopenií	1	3	žádné nebo jakýkoliv	< 1 %	< 5 %	žádné	jakýkoliv
definována na základě cytogenetické abnormality	0	1 - 3	< 15 % [!]	< 1 %	< 5 %	žádné	MDS-definující abnormality
Dětská refrakterní cytopenie	1 - 3	1 - 3	žádné	< 2 %	< 5 %		jakýkoliv

Tabulka č. 2: WHO klasifikační systém z roku 2016.

^x definice cytopenie: hemoglobin (< 10g/dL), počet krevních destiček (< 100 x 10⁹/L), absolutní počet neutrofilů (< 1.8 x 10⁹/L), výjimečně může být MDS prezentován mírnou anémií, nebo trombocytopenií nad těmito hranicemi. Počet monocytů v periferní krvi musí být < 1 x 10⁹/L

^{*} pokud je přítomna mutace *SF3B1*

[§] jedno procento blastů v periferní krvi musí být zaznamenáno minimálně při 2 odlišných událostech

[!] případy s ≥ 15 % prstenčitých sideroblastů mají dle definice signifikantní erytroidní dysplázii a jsou řazeny jako MDS-RS-SLD

Pro zhodnocení prognózy a přežití pacientů je zavedeno také několik prognostických systémů. V roce 1997 byl sestaven IPSS (International Prognostic Scoring System), který umožňuje na základě procentuálního obsahu blastů v kostní dřeni, počtu cytopenií a karyotypu zařadit pacienta do prognostické skupiny, která předpovídá délku trvání choroby a riziko transformace do AML. Tento systém lze uplatnit pouze na pacienty s *de novo* MDS (Greenberg PL et al., 1997). Prognostický systém byl v roce 2012 revidován na IPSS-R (Revised International Prognostic Scoring System), kdy byly přidány další prognostické hodnoty jako hladina hemoglobinu, počet krevních destiček, neutrofilů a detailnější analýza cytogenetických abnormalit a jejich prognostický význam (Greenberg PL et al., 2012; Schanz J et al., 2012). IPSS-R zařazuje pacienty do pěti kategorií rizika (velmi nízké až po velmi vysoké) na základě prognózy vývoje onemocnění s rozdílnou dobou přežití pacientů a dobou progresu onemocnění do AML (tabulka č. 3). Pacienti s velmi nízkým rizikem mají medián přežití 8,8 roku, na rozdíl od pacientů s velmi vysokým rizikem, kteří mají medián přežití 0,8 roku. Skóre rizika je vypočítáno jako součet jednotlivých bodů přiřazených podle rizikových faktorů, a to aberantních cytogenetických nálezů v buňkách KD, procentem blastů v KD a podle hodnot hemoglobinu, krevních destiček a neutrofilů v PK. Bodový systém jednotlivých rizik je uveden v tabulce č. 4. V tabulce č. 5 je uveden bodový systém dle cytogenetických abnormalit. Na webových stránkách mezinárodní nadace MDS Foundation (www.mds-foundation.org/ipss-r-calculator) je možné nalézt užitečný online kalkulačtor IPSS-R skóre.

Druhým prognostickým systémem je WPSS (WHO Classification-Based Prognostic Scoring System), který byl validovaný v roce 2015 (Della Porta MG et al., 2015). Tento systém má 5 skupin s rizikem od velmi nízkého až po velmi vysoké, skupiny jsou uvedeny v tabulce č. 6, bodové ohodnocení v tabulce č. 7.

Kategorie rizika	Skóre	Přežití *	Přechod do AML/25%*, ⁺
velmi nízká	≤ 1.5	8.8	NR
nízká	> 1.5 - 3	5.3	10.8
intermediární	> 3 - 4.5	3.0	3.2
vysoká	> 4.5 - 6	1.6	1.4
velmi vysoká	> 6	0.8	0.73

Tabulka č. 3: Revidovaný mezinárodní bodovací systém pro hodnocení prognózy MDS (IPSS-R).

NR-kritérium nebylo dosaženo

* medián (roky), do 25 % AML

⁺ doba (medián) do AML progresu u 25% pacientů

Kritérium/Hodnota	0	0.5	1	1.5	2	3	4
Cytogenetika (karyotyp)	velmi dobrá	-	dobrá	-	střední	nepříznivá	velmi nepříznivá
Blasty v KD (%)	≤ 2	-	> 2 < 5	-	5 - 10	> 10	-
Hemoglobin (g/dL)	≥ 10	-	8 < 10	< 8	-	-	-
Krevní destičky (x10⁹/L)	≥ 100	50 < 100	< 50	-	-	-	-
Neutrofily (x10⁹/L)	≥ 0.8	< 0.8	-	-	-	-	-

Tabulka č. 4: Bodové ohodnocení jednotlivých rizik v IPSS-R.

Prognostické podskupiny	Skóre	Cytogenetická abnormalita
Velmi dobrá	0	-Y, del(11q)
Dobrá	1	normální, del(5q), del(12p), del(20q), dvě aberace zahrnující del(5q)
Střední	2	del(7q), +8, +19, i(17q), jakýkoli jiný jeden nebo dva nezávislé klony
Nepříznivá	3	-7, inv(3)/t(3q)/del(3q), dvě aberace zahrnující -7/del(7q), komplex 3 abnormalit
Velmi nepříznivá	4	komplex více jak 3 abnormalit

Tabulka č. 5: Bodové ohodnocení jednotlivých cytogenetických abnormalit.

Kategorie rizika	Skóre	Přežití *	Progrese do AML ⁺
velmi nízká	0	141	3%
nízká	1	66	6%
intermediární	2	48	21%
vysoká	3-4	26	38%
velmi vysoká	5-6	9	80%

Tabulka č. 6: Bodový skórovací systém založený na klasifikaci WHO (WPSS).

* medián (měsíce)

⁺ progrese do AML během 2 let

Skóre	WHO kategorie	Karyotyp*	Transfuzní závislost ⁺
0	RA, RARS, 5q-	Dobrý	Není
1	RCMD	Střední	Pravidelná
2	RAEB-1	Nepřízniví	-
3	RAEB-2	-	-

Tabulka č. 7: Bodové ohodnocení jednotlivých rizik v WPSS.

* Karyotyp: Dobrý: normální, -Y, pouze del(5q-), pouze del(20q-)

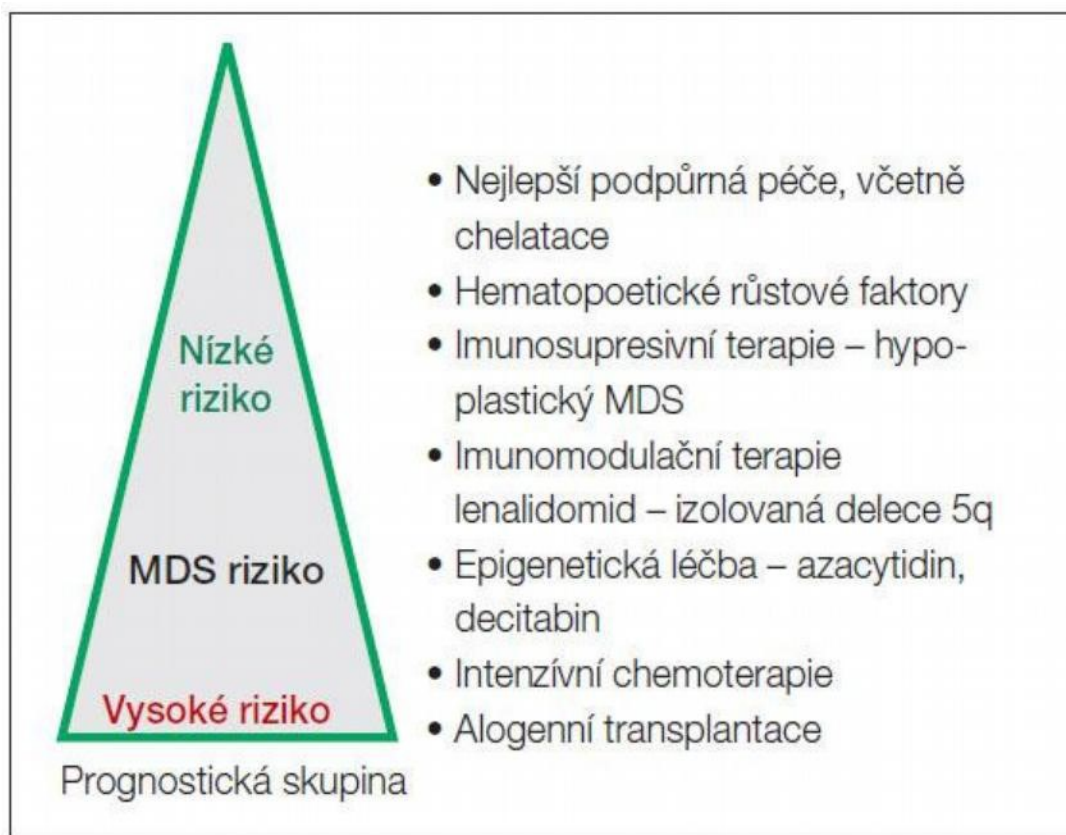
Nepříznivý: komplexní karyotyp, abnormality chr. 7

Střední: všechny ostatní

⁺ Transfuzní závislost je definována jako alespoň jedna transfuze každých 8 týdnů po dobu 4 měsíců

3.7 Léčba

Léčba pacientů je individualizovaná a založena na rizikovosti onemocnění. Léčebná strategie pro pacienty s nižším a středním rizikem spočívá v podpůrné, stimulační (podávání růstových faktorů krvetvorby), chelatační, imunosupresivní nebo imunomodulační terapii. Cílem je zlepšení kvality a prodloužení délky života. U pacientů s vysokým rizikem je terapie zaměřena na vymýcení patologického klonu a na prevenci transformace do AML. Pro dosažení těchto cílů jsou indikovány tyto typy léčby: hypometylační léčba, intenzivní chemoterapie s nebo bez následné transplantace krvetvorných buněk (Malcovati L et al., 2015). Jednotlivé léčebné postupy ukazuje zjednodušeně obrázek č. 1.

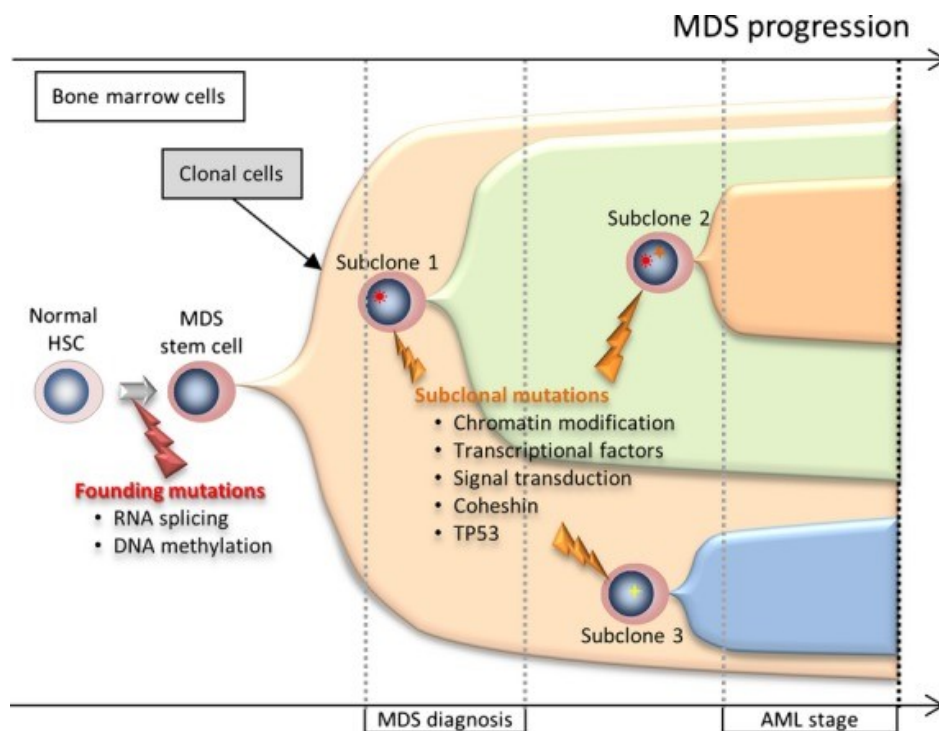


Obr. č. 1. Léčebná strategie u pacientů s MDS (Červinek L, Postgraduální medicína, 2011)

3.8 Patogeneze

Patogeneze MDS, i když je intenzivně zkoumána, není dosud objasněna. Předpokládá se, že stejně jako u ostatních nádorových onemocnění, se jedná o vícestupňový proces, který mění normální buňku na nádorovou. Dochází k postupnému hromadění genetických a epigenetických změn. Nejčastěji dochází ke kumulaci mutací v několika genech (2-3) téže buňky, které způsobí její maligní transformaci. Klonálním množением takto mutované

hematopoetické buňky, která má růstovou výhodu, dochází ke vzniku nádorové populace buněk, která postupně obsadí celou kostní dřeň (Harada H and Harada Y, 2015) . Klonální vývoj je znázorněn na obr.č.2.



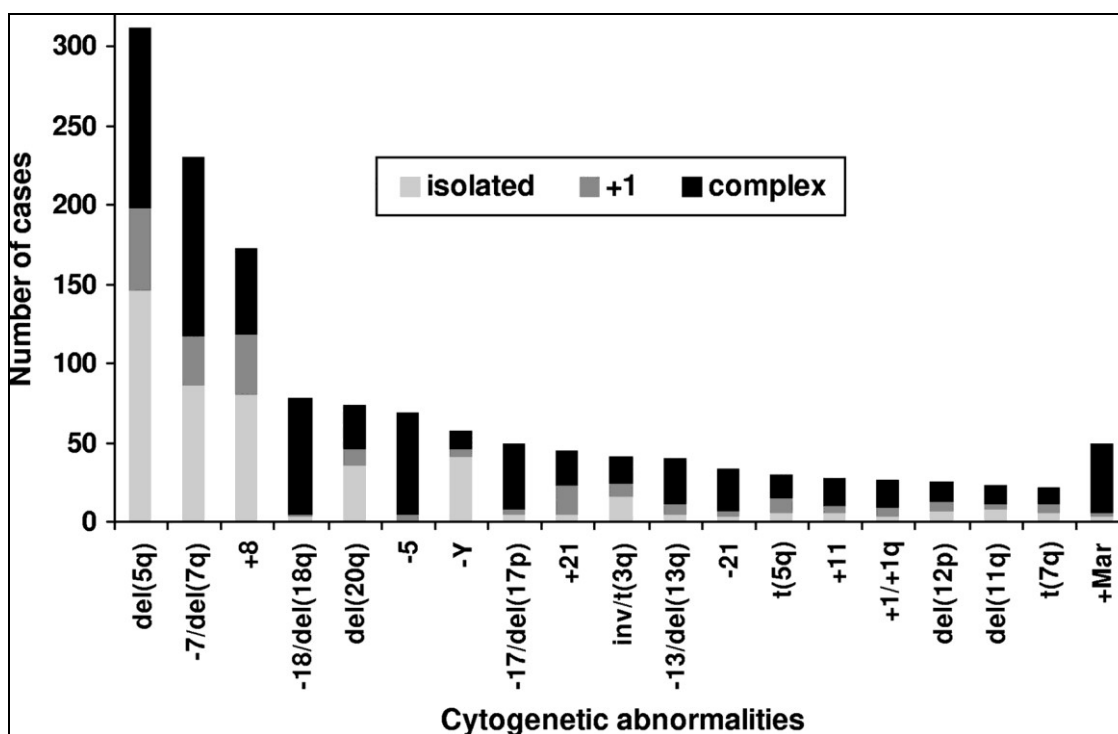
Obr. č. 2. Klonální vývoj hematopoetických kmenových buněk (HSC) u myelodysplastického syndromu (MDS) a progrese do akutní myeloidní leukémie (AML) (Harada H . et al, 2015).

MDS je velmi heterogenní onemocnění a můžeme ho zjednodušeně rozdělit na dvě stádia, časná a pokročilá. Časná stádium lze zařadit mezi prekancerózy, kdy nalézáme v krvetvorných buňkách zvýšenou apoptózu, která nenasvědčuje o nádorové povaze buněk. Ale zároveň detekujeme již některé vlastnosti nádorových buněk, jako je poškozená diferenciace, chromozomové aberace a mutace genů. Raná stádia považujeme tedy za indolentní formy MDS oproti agresivním, proliferačním, pozdním formám MDS, které již mají plnou charakteristiku nádorových buněk jako je zvýšená proliferace, snížená apoptóza, poškozená diferenciace, další chromozomální abnormality (často komplexní karyotyp), následné mutace, zejména v tumor supresorových genech a protoonkogenech. Přibližně 1/3 všech diagnostikovaných pacientů přechází neoplastickou transformací v AML. Příčiny této progrese zatím nejsou také přesně definovány (Kulasekararaj AG et al., 2013; Neuwirtová R, 2015; Pellagatti A et al., 2015; Sperling AS et al., 2017).

Vedle genetických faktorů se při patogenezi onemocnění uplatňují i faktory epigenetické a imunopatologické, mikroprostředí HSC a reparační mechanismy (Will B et al., 2012; Itzykson R et al., 2014; Kulasekararaj AG et al., 2013; Fozza C et al., 2016).

3.8.1 Cytogenetika

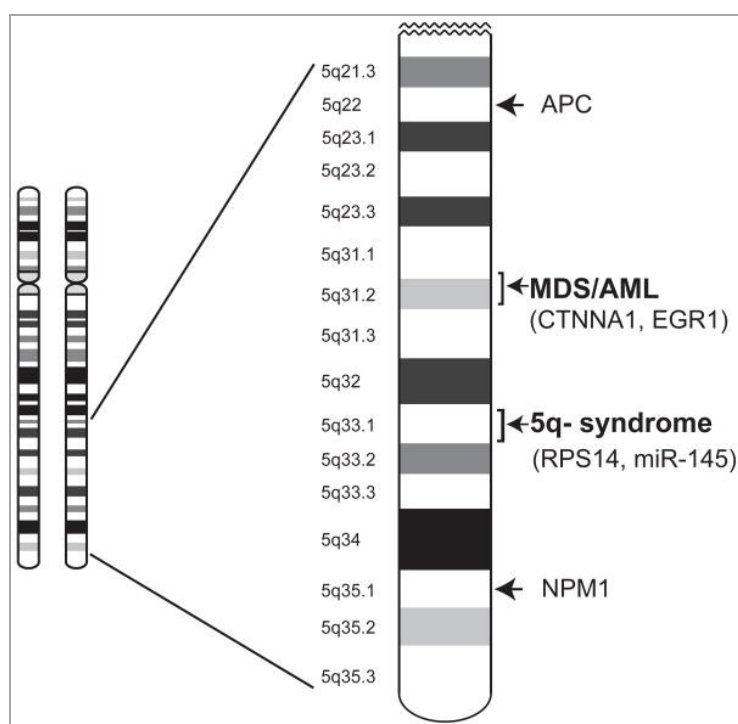
Přibližně u 55% MDS pacientů se nachází klonální cytogenetická aberace, u sekundárního MDS je to až 80%. Nejčastěji detekovanými aberacemi jsou úplné či částečné delece chromozomů, přídatné chromozomy a méně častými jsou vyvážené translokace (Haase D et al., 2007; Mallo M et al., 2011; Kern W et al., 2010; Gondek LP et al., 2008; Zemanova Z et al., 2014). Nejčastější chromozomální aberace jsou uvedeny v obrázku č. 3.



Obr. č. 3. Frekvence nejčastějších cytogenetických abnormalit u MDS rozdělených podle jejich výskytu: isolated: vyskytující se izolovaně; +1: vyskytující se v kombinaci s další abnormalitou; complex: komplexní karyotyp tj. kombinace více než 3 cytogenetických aberací (Haase D. et al, 2008).

Delece dlouhého raménka 5. chromozomu (del(5q)) patří mezi nejčastější detekované chromozomální aberace u MDS. Tuto intersticiální delecí nacházíme přibližně u 20% pacientů a to buď v rámci komplexního karyotypu u vysoko rizikových pacientů nebo jako izolovanou delecí 5q- u nízko rizikových pacientů (Mallo M et al., 2011; Brezinova J et al., 2012; Boulwood J et al., 2011). V rámci intersticiální delece v úseku q31-33 byly lokalizovány dva tzv. běžně deletované regiony (CDR). První CDR o velikosti přibližně

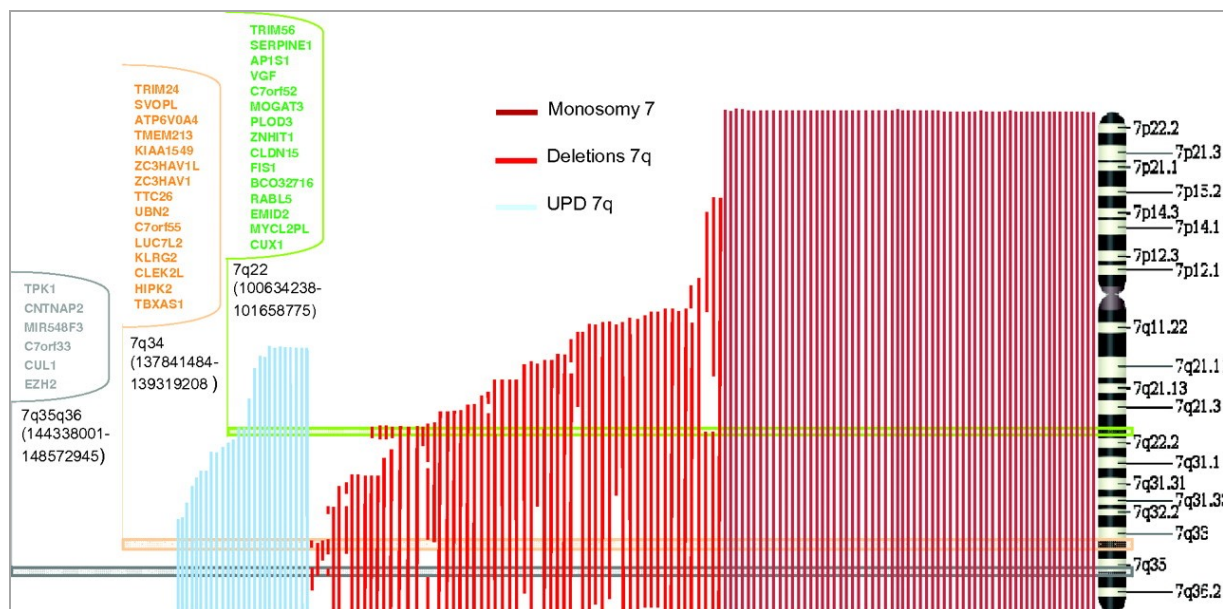
1,5Mb, typický pro 5q- syndrom, se nachází v lokusu 5q32 – 5q33 a obsahuje 40 kandidátních genů pro patogenezi 5q-syndromu (Pellagatti A et al., 2011; Ebert BL et al., 2011). Tento syndrom byl prvně popsán více jak před 30 lety, tito pacienti mají del(5q) jako jedinou chromozomální aberaci, jsou to převážně ženy středního věku, s lehkým až středním stupněm makrocytární anémie, nízkým počtem bílých krvinek, často s normální až zvýšenou hodnotou destiček, megakaryocyty s nelobulizovaným jádrem, nezvýšeným počtem blastů a dobrou prognózou (Boultonwood J et al., 2010; Neuwirtová R et al., 2009). Druhý CDR, nacházející se blíže k centromere, lokalizovaný kolem lokusu 5q31 je častější u pacientů s pokročilejšími stádii MDS a obsahuje 18 kandidátních genů zapojených v patogenezi. Lokalizace jednotlivých CDR oblastí je znázorněna na obrázku č. 4.



Obr. č. 4. Schéma běžně deletovaných oblastí, tzv. common deleted regions (CDR), u MDS pacientů s del(5q) a klíčové geny nacházející se v těchto oblastech (Ebert BL et al, 2011).

Druhá nejčastější chromozomální abnormalita u pacientů s MDS je aberace chromozomu 7 a to buď delece celého chromozomu (monozomie 7) nebo intersticiální delece dlouhého raménka (del(7q)). Na tomto chromozomu byly nalezeny tři CDR lokalizované v oblastech 7q22, 7q34 a mezi pruhy 7q35-7q36.1. Kandidátní geny této oblasti jsou znázorněny v obrázku č. 5. Aberace chromozomu 7 se vyskytují přibližně u 10% pacientů s primárním MDS a až u 40% pacientů se sekundárním MDS. Aberace na 7. chromozomu

jsou celkově spojeny s horším průběhem onemocnění a jsou spjaty s progresí nemoci, navíc monozomie 7 je asociována s horším průběhem než intersticiální delece del(7q) (Ademà V et al., 2013; Hussain FT et al., 2012; Merkerova MD et al, 2012; Cordoba I et al., 2012; Mallo M et al., 2011).



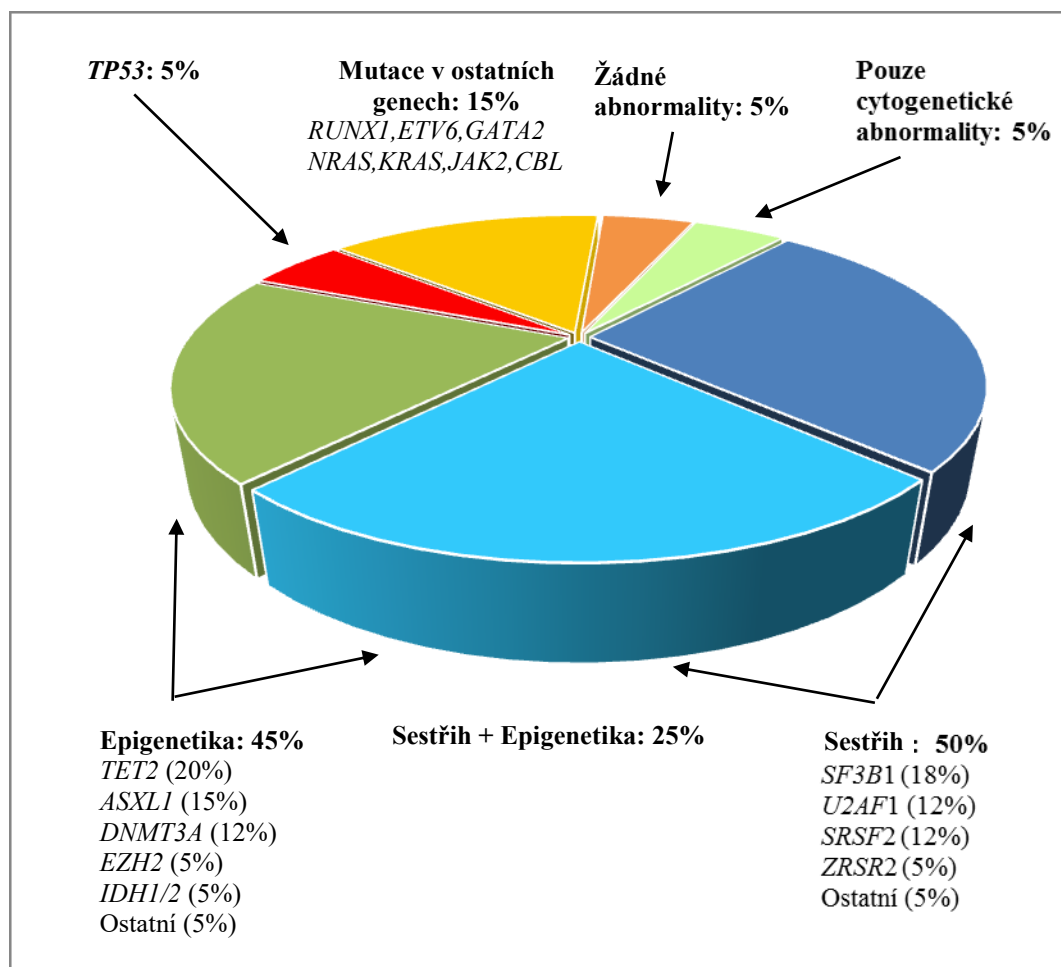
Obr. č. 5. Schéma běžně deletovaných oblastí (CDR) u MDS pacientů s monozomií 7, del(7q), uniparentální disomií (UPD) 7q a klíčové geny nacházející se v těchto oblastech (Jerez A, et al 2012).

Třetí nejčastější chromozomální abnormalita vyskytující se u pacientů s MDS je trizomie chromozomu 8, nachází se přibližně u 10% pacientů a je spojena se středním rizikem (Saumell S et al., 2012; Makishima H et al. 2010).

3.8.1 Mutace

Vedle cytogenetických změn, které jsou součástí používaného prognostického systému IPSS-R, se do popředí dostávají také somatické mutace nacházející se v různých genech. V klinické praxi nejsou zatím rutinně používány, ale probíhá mezinárodní výzkum zaměřený na mutační analýzy a jejich zařazení do prognostického skórovacího systému (IPSS-Rm: The Revised International Prognostic Scoring System "Molecular").

Až 90% pacientů s MDS nese alespoň jednu somatickou mutaci v některém z genů mutovaných u myeloidních malignit. Tyto geny lze rozdělit do několika kategorií, jak je znázorněno v obrázku č. 6 a podrobněji popsáno v následujícím textu.



Obr. č. 6. Nejčastěji nalézané mutace u MDS rozdělené do jednotlivých kategorií genů.

Mutované geny můžeme rozdělit do 5 kategorií. Nejčastěji mutované jsou geny z kategorie RNA-sestřihového aparátu, který je zodpovědný za posttranskripční modifikace mRNA, tzn. vyštěpování intronů z pre-mRNA, což je prováděno v jádře v tzv. spliceozomu, který je tvořen malými jadernými RNA a různými proteiny. Právě v genech pro tyto proteiny byly detekovány mutace. Jedná se o geny: *SF3B1*, *U2AF1*, *SRSF2*, *ZRSR2*, *SF3A1*, *SF1*, *U2AF65*, *PRPF40B* a *PRPF8*. Mutace v genu *SF3B1* má příznivý prognostický význam, nachází se u 18% pacientů a je asociována s MDS s prstenčitými sideroblasty (MDS-RS). Jako jediná mutace se využívá v novém WHO klasifikačním systému 2016, kdy pro určení diagnózy MDS-RS stačí detekovat prstenčité sideroblasty alespoň v 5% buňkách a zároveň detekovat mutaci v genu *SF3B1*. Ostatní nalezené mutace mají spíše nepříznivý prognostický význam. Mutace spliceozomu jsou vzájemně exkluzivní, to znamená, že se většinou vzájemně vylučují. Tyto mutace můžeme dále detekovat u pacientů s chronickou myelomonocytární leukémií (CMML), ale méně často jsou přítomny u pacientů s AML (Bejar R, 2016; Mian SA et al., 2015; Malcovati L et al., 2015). Spliceozom byl také v posledních letech vybrán jako

terapeutický cíl a připravuje se selektivní inhibitor *SF3B1* s názvem H3B-8800 pro léčbu MDS, AML a CMML (Saez B et al., 2017).

Druhé nejčastěji vyskytující mutace jsou mutace v genech pro epigenetické faktory, které buď ovlivňují metylaci DNA (*DNMT3A*, *TET2*, *IDH1/2*) nebo histonové modifikace (*ASXL1*, *EZH2*, *UTX*, *SETBP*, *ATRX*). Nejčastěji mutovaný gen je *TET2*, který má neutrální prognostický význam. V některých studiích byly mutace v genu *TET2* spojovány se zvýšenou odpovědí na hypometylační léčbu, zejména když není mutován gen *ASXL1*. Mutace v ostatních genech epigenetického aparátu jsou spojeny spíše se zhoršenou prognózou, zejména v genech *EZH2*, *IDH2* a *ASXL1* (Bejar R et al., 2011; Cazzola M et al., 2013; Katoh M, 2016; Malcovati L et al., 2015; Pellagatti A and Boulton J, 2015). Jsou také vedeny studie s *EZH2*, *IDH2* a *UTX* inhibitory pro možné terapeutické účinky (Gill H et al., 2016).

Třetí kategorie genů, které bývají u pacientů mutované, jsou geny signální transdukce. Jedná se konkrétně o mutace v genech *NRAS*, *KRAS*, *CBL*, *FLT3*, *JAK2* a *PTPN11*. Mutace v genech *NRAS*, *KRAS* a *PTPN11* se častěji vyskytují u pacientů s pokročilejšími stádii a jsou asociovány se zhoršenou prognózou (Bejar R et al., 2012). Navíc bylo zjištěno, že i nízká frekvence mutací $< 0,5\%$ v genu *NRAS* má negativní prognostický vliv na celkové přežití (overall survival, OS) u pacientů s nízkým rizikem (Murphy DM et al., 2013).

Transkripční faktory tvoří další skupinu genů, u kterých se vyskytují mutace u MDS pacientů. Jsou to geny *RUNX1*, *GATA2*, *ETV6* a *WT1*. Mutace v prvních dvou genech jsou nejen somatické, ale také germinální a mohou být příčinou familiárního MDS (Bannon SA et al. 2016; Churpek JE et al, 2015).

Samostatnou skupinu tvoří mutace v tumor supresorovém genu *TP53*, který je mutovaný u většiny nádorů včetně hematologických malignit. Je to klíčový regulační faktor celé řady genů ovlivňujících proliferaci, apoptózu, reparaci DNA a angiogenezi. Standardně se v buňkách protein p53 vyskytuje jen ve velmi malém množství, ale za stresových podmínek se jeho koncentrace zvyšuje. Gen *TP53* často podléhá bodovým záměnám, nejčastěji typu missense v DNA-vazebné doméně. Důsledkem mutací jsou zkrácené a nefunkční formy proteinu nebo konformačně pozměněný protein. Gen je lokalizován na krátkém raménku chromozomu 17, který může být u pacientů s MDS deletován (dochází k částečné delecii nebo ke ztrátě celého chromozomu) nebo může vzniknout v místě lokalizace genu získaná uniparentální disomie (UPD). Druhá alela genu bývá právě v těchto případech často mutována, což vede k úplné ztrátě funkce nádorového supresoru (Bieganski KT et al., 2014; Aubrey BJ et al., 2016; Svobodova K et al, 2016). Mutace v tomto genu jsou často spojovány s pokročilými stádii MDS, nachází se až u 70% pacientů s komplexním karyotypem a 35%

pacientů s MDS související s terapií. U pacientů s nízkým rizikem se vyskytují přibližně v 10%, ale jsou častější u pacientů s izolovanou *del(5q)*, přibližně u 20% pacientů. Mutace v genu *TP53* jsou nezávislý prognostický faktor OS a doby přežití bez progresu (progression free survival, PFS) pro pacienty s nízkým i vysokým rizikem a hrají nepříznivou roli v transformaci do AML (Bejar R et al., 2014; Sebaa A et al., 2012; Fidler C et al., 2004; Kulasekararaj AG et al., 2013; Jädersten M et al., 2011; Sallman DA et al., 2017; Wong TN et al., 2015; Saft L et al. 2014).

Dále bylo popsáno, že každá další detekovaná mutace zhoršuje prognózu pacienta (Bejar R et al, 2012; Papaemmanuil E et al., 2013, Bejar R, 2014).

Nutno je však také podotknout, že výše popsané mutace můžeme také nalézt přibližně u 10% asymptomatických starších dospělých (starších 70 let). Somatické mutace v krvetvorných buňkách vedou ke klonální expanzi, která vzniká v průběhu stárnutí člověka. Nejčastěji jsou to mutace v genech RNA-sestřihového aparátu a epigenetických faktorech. U většiny lidí, kteří získali klonální krvetvorbu v průběhu stárnutí, se však nikdy nerozvine MDS. Tento fenomén byl popsán jako klonální hematopéza neurčitěho potenciálu (Clonal hematopoiesis of indeterminate potential, CHIP) (Steensma DP et al., 2015; Link DC and Walter MJ, 2016). S klonální hematopoézou souvisí nové „premaligní“ myeloidní entity, které byly v posledních letech ustanoveny. Jedná se o idiopatickou cytopenii neurčitěho významu (idiopathic cytopenias of undetermined significance; ICUS), klonální cytopenii neurčitěho významu (clonal cytopenia of undetermined significance; CCUS) a idiopatickou dysplázií neurčitěho významu (Idiopathic Dysplasia of Undetermined Significance; IDUS). ICUS je definována jako cytopenie jedné nebo více buněčných linií, která trvá déle jak 6 měsíců. U pacientů nebyla zjištěna klonální hematopoéza a nejsou splněny kritéria MDS. Pacienti s CCUS mají cytopenii jedné nebo více buněčných linií, která trvá déle jak 6 měsíců, mají klonální hematopézu a nejsou splněna kritéria MDS. Jedná se o podmnožinu CHIP s větší pravděpodobností progresu do hematologické neoplázie. Pacienti s IDUS mají dysplázií ve více jak 10% buňkách, nemají cytopenii trvající více jak 6 měsíců a mají definovanou klonální hematopoézu (Kwok B et al., 2015; Malcovati L et al., 2015; Lichtman MA, 2015).

3.9 Úvod k jednotlivým řešeným tématům

3.9.1 Úvod k mutacím v genu *TP53*

Informace o mutacích v genu *TP53* vyskytujících se u pacientů s MDS byly popsány v rámci kapitoly 3.8.2 Mutace.

3.9.2 Úvod k problematice hypometylační léčby

Hypometylační (demetylační) terapie se v současné době používá v terapii nemocných s pokročilými formami MDS, kteří nejsou indikováni k transplantaci krvetvorných buněk. (Itzykson R et al., 2011; Fenaux P, et al, 2011; Silverman LR et al., 2002; Diesch J et al., 2016). Princip terapie je založen na existenci abnormální epigenetické modifikace, tedy konkrétně abnormální DNA metylaci. Hypometylační léčba je namířena proti DNA hypermetylaci celé řady genů, včetně tumor supresorových, u kterých způsobuje aktivaci dříve umlčené exprese. DNA metylace je modifikace cytosinů, realizovaná přidáním metylového zbytku –CH₃ k cytosinu enzymem DNA metyltransferázou (DNMT) především v CpG dinukleotidech. Tyto dinukleotidy se vyskytují hojně v repetitivních sekvencích a tzv. CpG ostrůvkách v promotorových oblastech genů, kde metylace brání vazbě transkripčních faktorů nebo umožňuje vazbu inhibičních komplexů. Navíc byla prokázána aberantní metylace celého genomu u MDS a souvislost mezi vzestupnou hypermetylací a progresí onemocnění (Figueroa ME et al., 2009; Hopfer O et al., 2009; Jiang Y et al., 2009; del Rey M et al., 2013). Methylace DNA je reverzibilní proces a lze ji změnit pomocí specifických molekul, inhibitorů DNMT, jako jsou 5- azacytidin (azacitidin) nebo 5-aza-2'-deoxycitidin (decitabin). V České republice je léčba azacitidinem (obchodní název Vidaza) hrazena z prostředků veřejného zdravotního pojištění v první linii léčby dospělých pacientů, kteří nejsou způsobilí k transplantaci hematopoetických kmenových buněk a jejichž klinický stav umožňuje léčbu: tzn. MDS intermediárního rizika 2. stupně a vysokého rizika podle IPSS, CMML s 10-29% blastů v kostní dřeni bez myeloproliferativního onemocnění, AML s 20-30% blastů a dysplazií ve více buněčných liniích, podle klasifikace WHO. Cílem terapie je zvýšení počtu červených krvinek, nezávislost na transfuzích, zvýšení hladiny hemoglobinu, zvýšení počtu bílých krvinek nebo krevních destiček a/nebo snížení procenta blastů v kostní dřeni a celková stabilizace onemocnění. Azacitidin (AZA) je ribonukleosidový analog cytidinu s antineoplastickými účinky, které jsou řízeny hlavně dvěma mechanismy: inhibicí DNMT při nízkých dávkách, což vede k hypomethylaci DNA; a přímou cytotoxicitu v abnormálních

hematopoetických buňkách kostní dřeně v důsledku inkorporace azacitidinu do DNA a RNA ve vysokých dávkách, což vede ke smrti buněk (Glover AB et al., 1987). Oba mechanismy snižují počet abnormálních krevních buněk a pomáhají řídit růst buněk.

Několik klinických studií ukázalo, že po podání AZA dosáhnou někteří pacienti trvalého hematologického zlepšení a terapie významně prodlouží celkové přežití (OS) (Itzykson R et al, 2011; Fenaux P et al., 2009; Zeidan AM et al., 2016). Nicméně pouze přibližně polovina pacientů reaguje na léčbu a klinický stav pacientů po selhání léčby AZA je velmi špatný. Proto je žádoucí identifikovat pacienty, kteří budou na léčbu pozitivně reagovat, a navrhnout alternativní přístupy k léčbě pacientů, u nichž se očekává špatná odpověď na AZA.

Na molekulární úrovni bylo provedeno několik studií s cílem odhalit prediktory léčby. Například byl sledován vliv mutace v genu *TET2* na odpověď při demetylační léčbě (Bejar R et al., 2014), úroveň methylace fosfoinositid / fosfolipasy C beta 1 (beta1 PI-PLC) u MDS (Follo MY et al., 2009), podíl BCL-2-like protein 10 (BCL2L10) pozitivních buněk v kostní dřeni MDS a AML (Cluzeau T et al., 2009), hladina exprese uridin-cytidinu kinázy (UCK1) u MDS a AML (Valencia A et al., 2014) a exprese CD25 antigenu v CD34 + buňkách MDS (Miliades P et al., 2014). Nicméně dosud nebyl sestaven konkrétní expresní profil genů, který by specificky předurčoval skupinu kladně reagujících pacientů na hypometylační léčbu.

3.9.3 Úvod k problematice bodových polymorfismů

SNPs (Single Nucleotide Polymorphisms) nebo-li jednonukleotidové (bodové) polymorfismy v sekvenci DNA jsou nejvíce rozšířené polymorfismy v genomu člověka. Jejich odhadované množství je několik milionů a tvoří asi 85% genetických polymorfismů člověka. SNP se dále sdružují do bloků – haplotypů, které se zpravidla dědí společně. SNP je vhodným genetickým markerem pro svoji frekvenci (na každých 500 až 1000bp), stabilitu a relativně rovnoměrnému rozmístění v genomu. SNPs mohou sloužit k odhalování genetických predispozic k onemocněním v rámci asociačních studií, kdy se konkrétní varianta SNP, nalezená u jedinců s nemocí porovná se zdravými jedinci. Případná statisticky významná odlišnost upozorní, že tato alela nějakým způsobem s onemocněním souvisí nebo je ve vazebné nerovnováze (linkage disequilibrium) se skutečnou kauzální alelou a slouží tedy víceméně jako její marker. Sestavení podrobné SNPs mapy může být využito ke zjištění genů podílejících se na vzniku dané choroby.

Předchozí studie popsaly například polymorfismus v genu *GSTP1*-105Val, který je spojen se zvýšeným rizikem vzniku MDS (Fabiani E et al 2009), stejně jako polymorfismus v

genu *EPO* (Ma W et al., 2010). Další studie, která se zabývala asociací mezi SNPs v genech imunitní systému a MDS, detekovala 2 kandidátní polymorfismy v genech *RTEL1* a *MTHFR* (Danjou F et al., 2016).

4 KLINICKÉ SOUBORY, METODY A VÝSLEDKY JEDNOTLIVÝCH TÉMAT

4.1 Mutace v genu *TP53*

4.1.1 Klinický soubor

Vzorky KD a / nebo PK byly získány od 154 pacientů léčených na Ústavu hematologie a krevní transfuze (n = 82) a 1. Interní kliniky - Klinika hematologie VFN a 1. LF UK v Praze (n = 72), Praha. Vzorky byly získány během rutinního klinického hodnocení. Dále bylo vyšetřeno 10 zdravých kontrolních vzorků odpovídajícího věku a dva vzorky pupečnickové krve. Čtyři z deseti kontrolních vzorků byly izolovány z KD a zbývajících šest vzorků bylo izolováno z PK. Průměrný věk kontrol byl 64,7 let (rozsah: 30-80 let). Všechny subjekty poskytly informovaný souhlas a studie byla schválena místní etickou komisí. Všichni pacienti byli klasifikováni podle IPSS kategorií. Do studie byli zařazeni pouze pacienti MDS spadající do skupiny s nižším rizikem progresu do AML. To znamená, pacienti s nízkým (n=70) nebo středním-1 rizikem (n=81) definovaných dle IPSS. Tři pacienty nebylo možné zařadit, protože cytogenetická data nebyla dostupná. Podle WHO 2008 klasifikace mělo 6 pacientů refrakterní anemii (RA), 6 refrakterní anemií s prstenčitými sideroblasty (RARS), 92 refrakterní cytopenií s multilineární dysplázií (RCMD), 6 RCMD s prstenčitými sideroblasty (RCMD-RS), 38 MDS s izolovanou delecí (5q) a 6 refrakterní anemií s přebytkem blastů 1 (RAEB-1). Průměrná doba sledování pacientů byla 58,6 měsíce (rozmezí: 0-253). Během této doby 23,4% pacientů (n=36) progredovalo (alespoň do RAEB-2) a 34% pacientů (n=53) zemřelo. Údaje od 58,4% pacientů (n=90) bylo cenzorováno k poslednímu známému dni a 7,1% (n=11) bylo cenzorováno ke dni transplantace hematopoetických kmenových buněk. Průměrná doba vyšetření mutačního stavu byla 32,1 měsíce (rozmezí: 0-131 měsíců). Celkově 103 pacientů (66,9%) obdrželo podpůrnou léčbu, 8 pacientů (5,2%) bylo léčeno azacitidinem pro progresi onemocnění, 28 pacientů (18,2%) dostávalo lenalidomid a 2 pacienti (1,3%) dostali azacitidin po předchozí léčbě lenalidomidem. Základní charakteristiky pacientů jsou uvedeny v tabulce č. 8.

	Celkem (%)	Pacienti bez mutace (%)	Pacienti s mutací (%)	P hodnota *
Počet pacientů	154	134	20	
Pohlaví				0.35
Muži	68 (44)	61 (46)	7 (35)	
ženy	86 (56)	73 (54)	13 (65)	
Věk, median (rozmezí)	68	68 (22-85)	67 (50-79)	0.92
Krevní obraz v době vyšetřování				
Hemoglobin, průměr (g/l)	92.3	91.9	95.1	0.39
Neutrofily, průměr (g/l)	2.8	3	1.6	0.34
Destičky, průměr (10 ⁹ /l)	243.8	247.6	217.8	0.65
Počet blastů (%)	2.5	2.4	3.2	0.11
WHO klasifikace 2008				0.22
RA	6 (4)	6 (4)	0 (0)	
RA-RS	6 (4)	6 (4)	0 (0)	
MDS s izolovanou del(5q)	38 (25)	29 (22)	9 (45)	
RCMD	92 (60)	83 (62)	9 (45)	
RCMD-RS	6 (4)	5 (4)	1 (5)	
RAEB1	6 (4)	5 (4)	1 (5)	
IPSS				0.06
Low	70 (45)	65 (49)	5 (25)	
Intermediate-1	81 (53)	66 (49)	15 (75)	
NA	3 (2)	3 (2)	0 (0)	
IPSS-R				0.99
Very low	25 (16)	22 (16)	3 (15)	
Low	76 (49)	66 (49)	10 (50)	
Intermediate	43 (28)	37 (28)	6 (30)	
High	7 (5)	6 (4)	1 (5)	
NA	3 (2)	3 (2)	0 (0)	
Karyotyp				0.01
Normal	53 (34)	51 (38)	2 (10)	
Abnormal	98 (64)	80 (60)	18 (90)	
NA	3 (2)	3 (2)	0 (0)	
Karyotyp dle del(5q)				< 0.001
bez del(5q)	79 (51)	76 (57)	3 (15)	
del(5q)	72 (47)	55 (41)	17 (85)	
NA	3 (2)	3 (2)	0 (0)	
Výsledek				
Leukemická transformace	36 (23)	27 (20)	9 (45)	
Úmrtí	53 (34)	41 (31)	12 (60)	
Přežití medián (měsíce)	116.6	138.0	80.9	0.09
Léčba				
Lenalidomide	28 (18)	19 (14)	9 (45)	
5-azacytidine	8 (5)	6 (4)	2 (10)	

LEN + AZA	2 (1)	0 (0)	2 (10)	
HSCT	11 (7)	10 (7)	1 (5)	

Tabulka č. 8: Základní charakteristika pacientů.

4.1.2 Metody

Buněčná separace a izolace nukleových kyselin

K separaci mononukleárních buněk byla zvolena separace pomocí gradientové centrifugace s roztokem Ficoll-Hypaque (GE Healthcare). CD34+, CD3+ a CD14+ buňky byly separovány pomocí imuno-magnetické separace na základě povrchových markerů buněk (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany).

DNA byla izolována vysolovací metodou (precipitace proteinů pomocí NaCl). V některých případech byla také izolována DNA z morfologických sklíček s nátěry kostní dřeně pomocí ChargeSwitch® Forensic DNA Purification Kit (Life Technologies, Carlsbad, CA). Koncentrace byla měřena na Nanodropu a s použitím fluorimetru Qubit.

Cytogenetické analýzy

Nestimulované buňky KD byly kultivovány po dobu 24 hodin v médiu RPMI 1640 s 10% fetálním telecím sérem. Vzorky byly připraveny standardními technikami s Colcemidem, které zahrnovaly hypotonické ošetření, fixaci v methanolu / kyselině octové a G-pruhování s barvením Wright-Giemsovým roztokem. Karyotypy byly popsány v souladu s Mezinárodním systémem lidské cytogenetické nomenklatury (ISCN 2013) (Shaffer LG et al., 2013). Pro potvrzení genetické delecce v oblasti 5q31 byla použita dvojitá sonda Vysis LSI EGR1 / D5S23, D5S721 (Abbott, Downers Grove, IL). Testy FISH byly provedeny podle protokolu výrobce a bylo analyzováno nejméně 200 interfázových jader. Komplexní chromozomové aberace byly studovány metodami mFISH a mBAND pomocí barevných sad 24Xyte a Xyte a počítačového analytického systému ISIS (MetaSystems, Altlußheim, Německo).

Sekvenace DNA

Amplikonové sekvenování genu *TP53* (exony 4-11) bylo provedeno na přístroji GS Junior 454 (Roche, Indianapolis, IN). Na přípravu knihovny byly použity primery, které byly validovány v rámci IRON-II (Interlaboratory Robustness Of Next generation sequencing) European LeukemiaNet. Průměrné pokrytí sekvenovaných exonů u genu *TP53* bylo přibližně 900 krát. Zarovnání a vyhledání variant bylo provedeno pomocí balíčku GS software analýzy

dat (Roche). V případech, kdy jsme potřebovali větší citlivost u genu *TP53*, byly příslušné exony re-sekvenovány s větší hloubkou čtení (3000 krát). Pokud byla objevena mutace, byly vyšetřeny i další buněčné populace (CD34+, CD34-, CD14+, CD3+, granulocyty, mononukleární buňky) a všechny dostupné předchozí i následné odběry. Celkově bylo vyšetřeno 310 vzorků na mutace v genu *TP53*. Všechny *TP53* mutace s alelickou frekvencí >20% byly validovány pomocí Sangerova sekvenování (Applied Biosystems 3500). *TP53* mutace s alelickou frekvencí <20% byly validovány minimálně 2 nezávislými NGS experimenty. Mutace *TP53* byly anotovány pomocí databáze IARC TP53 (<http://p53.iarc.fr>). Ze sekvenačních dat jsme získali tzv. variantní alelickou frekvenci (VAF), která byla definována jako počet čtení nesoucí mutaci vydělená celkovým počtem čtení. 50% mutantní alelická zátěž v oblastech s diploidní DNA v homogenní buněčné populaci naznačuje, že všechny buňky obsahující danou variantu jsou v heterozygotním stavu (100% buněk nese heterozygotní formu mutace).

Statistická analýza

Kaplan-Meierova analýza byla použita pro odhad křivek přežití a log-rank test pro porovnání dvou kritérií. Srovnání dle jednotlivých sledovaných faktorů (univariátní analýza) bylo provedeno pomocí log-rank testu, multivariátní analýza Coxovou metodou. Korelace velikosti mutovaných klonů v různých typech buněk byla měřena pomocí Spearmanova korelačního koeficientu. P-hodnoty (oboustranný test) menší než 0,05 byly považovány za statisticky významné. Analýza byla provedena za použití IBM SPSS Statistics (IBM, NY, USA) a grafy byly připraveny za použití GraphPad Prism verze 6.00 (La Jolla, CA, USA).

4.1.3 Výsledky

Cytogenetická analýza není informativní u třetiny pacientů

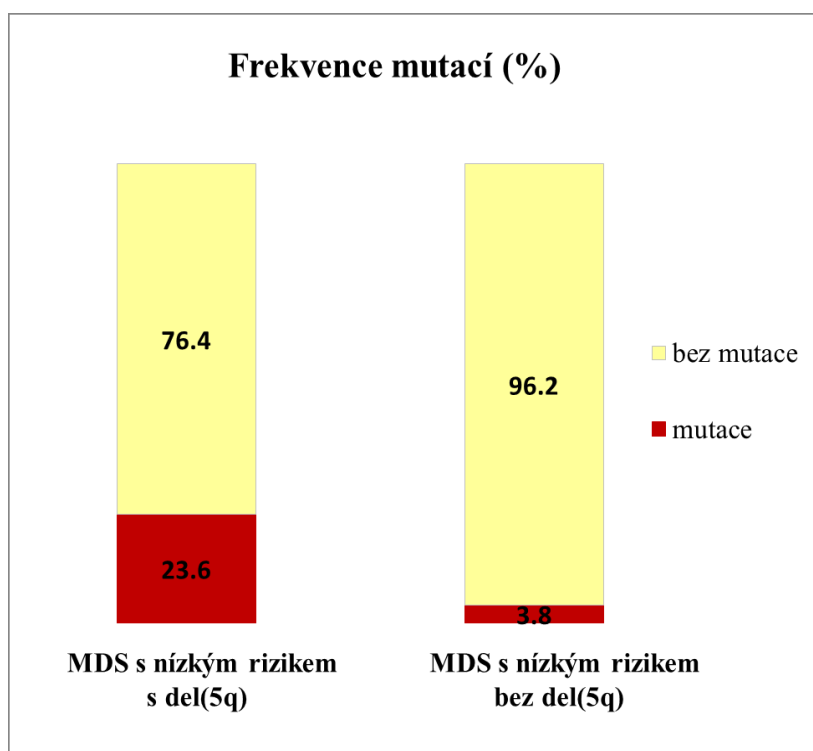
Cytogenetická analýza ukázala normální karyotyp u 53 pacientů (34,4%) a abnormální karyotyp u 98 pacientů (63,6%); 3 (1,9%) pacienti neměli cytogenetická data k dispozici. Celkem 72 pacientů (46,8%) mělo del(5q). Komplexní karyotyp (včetně vzájemné translokace mezi chromozomy 7 a 17) byl nalezen u jednoho pacienta s alelickou frekvencí této mutace > 99%. Uniparentální dizomie 17p byla nalezena u jednoho pacienta s frekvencí alel 62%.

TP53 mutace byly identifikovány u 1/8 pacientů s nižším rizikem MDS a 1/4 pacientů s *del(5q)*

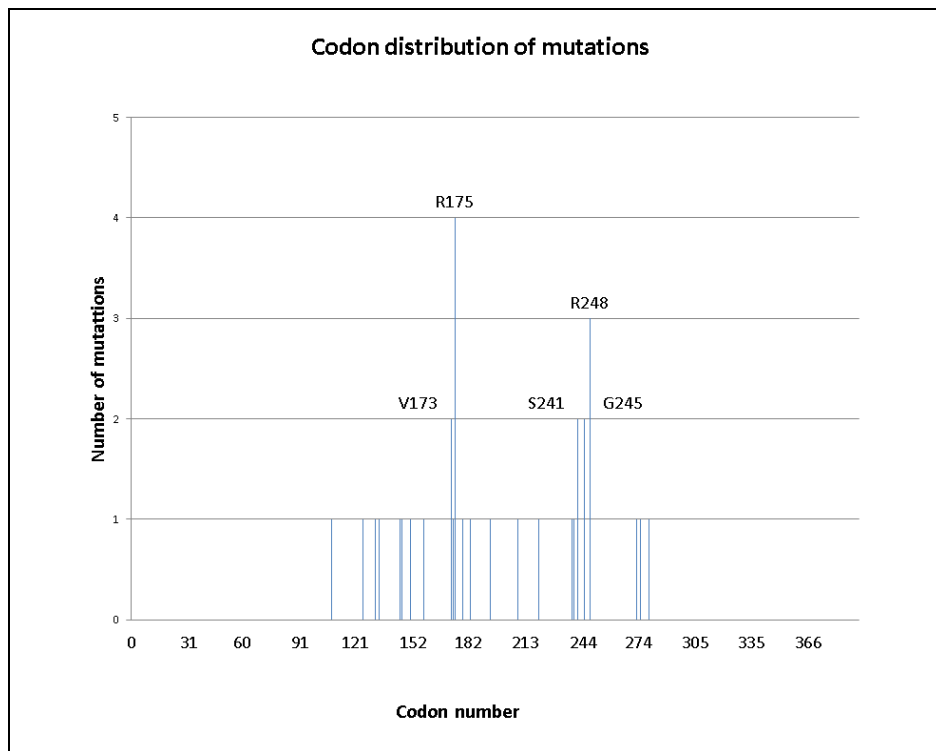
Nejprve byly sekvenovány vzorky KD pacientů v průměru 32,1 měsíců od stanovení diagnózy (rozmezí: 0-131 měsíců). Pokud byla mutace nalezena, byly následně sekvenovány ostatní buněčné populace a všechny dostupné vzorky z předchozích a následných odběrů.

Celkově jsme identifikovali 33 mutací u 20 ze 154 nízkorizikových pacientů (13,0%). Pacienti s *del(5q)* vykazovali nápadně zvýšenou prevalenci mutací ve srovnání s pacienty bez *del(5q)* 23,6% (17/72) oproti 3,8% (3/79) (obrázek č. 7).

Šest pacientů mělo dvě mutace, jeden pacient měl tři mutace a jeden pacient nesl šest mutací. Všechny mutace byly lokalizovány v sekvenčně specifické DNA vazebné doméně *TP53* (obr. č. 8). Popis jednotlivých mutací je uveden v tabulce č. 9 a profil typu mutací je uveden na obrázku č. 9. Většina mutací byla missense mutace ($n = 29$), zatímco mutace nonsense ($n = 2$) a mutace v místech sestřihu ($n = 2$) byly mnohem vzácnější. Mutace R175H byla opakovaně nalezena u čtyř pacientů; R248W u tří pacientů; S241F, G245 a V173M byly identifikovány u dvou pacientů, ostatní mutace byly jedinečné.



Obr. č. 7. Frekvence výskytu mutace *TP53* u pacientů s nízkým rizikem MDS s a bez *del(5q)*.

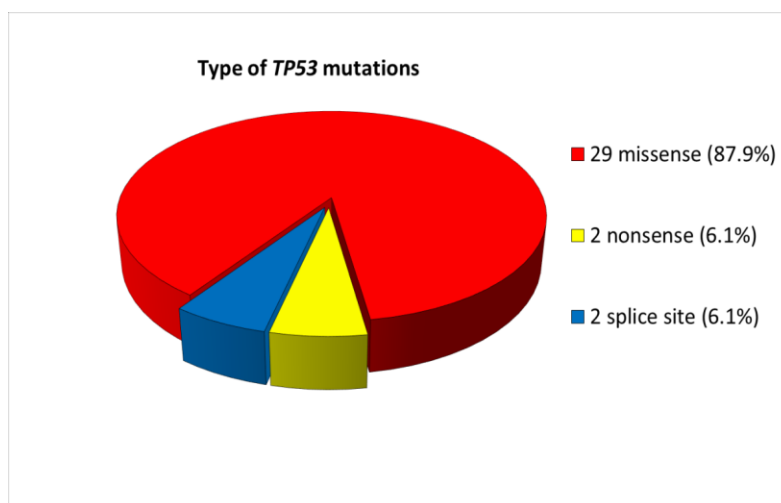


Obr. č. 8. Histogram zobrazení polohy somatických bodových mutací v kódující sekvenci genu *TP53*. Data z IARC *TP53* Database. Rozmístění a počet mutací v genu *TP53*.

Patient ID	Nucleotide position	Protein description	CD34+ (%)	CD34-/MNC (%)	CD3+ cells (%)	CD14+ cells (%)	Granulocytes (%)	Cytogenetics	Interphase FISH del(5q)
624	c.517G>A	p.V173M	49.6	47.9	2.8	47.8	42.6	46,XX[16] 46,XX,del(5)(q13.2q34)[6]	89%
1125	c.581T>G	p.L194R	39.6	42.3	0.6	45.8	42.3	46,XY[15]	OK
646	c.548C>A	p.S183*	2.2	3.7	ND	1.8	2.0	46,XX[15] 46,XX,del(5)(q14q33.3)[7]	33%
306	c.733G>A c.400T>C	p.G245S p.F134L	23.9 3.5	20.5 ND	1.7 0.3	8.5 2.0	17.7 2.7	0 mitosis	28%
373	c.722C>T	p.S241F	41.9	31.1	0.0	29.2	30.2	46,XX[8] 46,XX,del(5)(q13q33)[2]	78%
272	c.734G>A	p.G245D	8.9	14.7	1.4	15.6	23.7	46,XY[15]	54%
1098	c.715A>G	p.N239D	9.0	9.5	1.5	21.7	32.9	46,XX[1] 46,XX,del(5)(q13.3q33.3)[21]	84%
1100	c.524G>A c.438G>A	p.R175H p.W146*	ND	61.4 13.7	1.1 0.0	42.0 15.4	64 25.3	Complex karyotype	ND
837	c.824G>A	p.C275Y	ND	76.8	1.1	99.1	73.2	Complex karyotype	ND
926	c.524G>A c.473G>A	p.R175H p.R158H	ND	1.1 1.86	0.0	ND	0.7 2.3	46,XX [18]	ND
1084	c.451C>T c.520A>T	p.P151S p.R174W	ND	2.1 2.5	0.1 0.2	ND	2.1 4.8	0 mitosis	19%

1095	c.659A>G c.626G>A	p.Y220C p.R209K	11.7 ND	10.0 1.7	ND	ND	ND	46,XX[13] 46,XX,del(5)(q15q33.3)[9]	ND
141	c.375G>A	p.T125T	4.7	5.0	ND	ND	3.6	46,XY [22]	OK
1043	c.818G>T	p.R273L	ND	30.8	ND	ND	ND	0 mitosis	88%
131	c.839G>T	p.R280I	30.0	18.1	ND	ND	ND	46,XY [22]	ND
112	c.395A>T	p.K132M	ND	3.0	ND	ND	ND	46,XX[4] 46,XX,del(5)(q31q33)[1]	43%
496	c.434T>C c.713G>C c.722C>T	p.L145P p.C238S p.S241F	ND	2.3 2.1 0.4	ND	ND	ND	46,XX[22]	13%
1411	c.376-2A>G c.536A>G c.742C>T c.323G>T c.524G>A c.743G>A	p.? p.H179R p.R248W p.G108V p.R175H p.R248Q	ND	3.5 34.9 2.2 1.6 1.8 1.4	ND	ND	ND	47,XX,+8[17] 46,XX,del(5)(q13q33)[3]	50%
1207	c.742C>T	p.R248W	ND	37.1	ND	ND	ND	0 mitosis	29%
1436	c.517G>A c.524G>A	p.V173M p.R175H	ND	2.3 19.7	ND	ND	ND	46,XX[1] 46,XX,del(5)(q14q33.3)[16]	ND

Tabulka č. 9. Popis jednotlivých mutací.

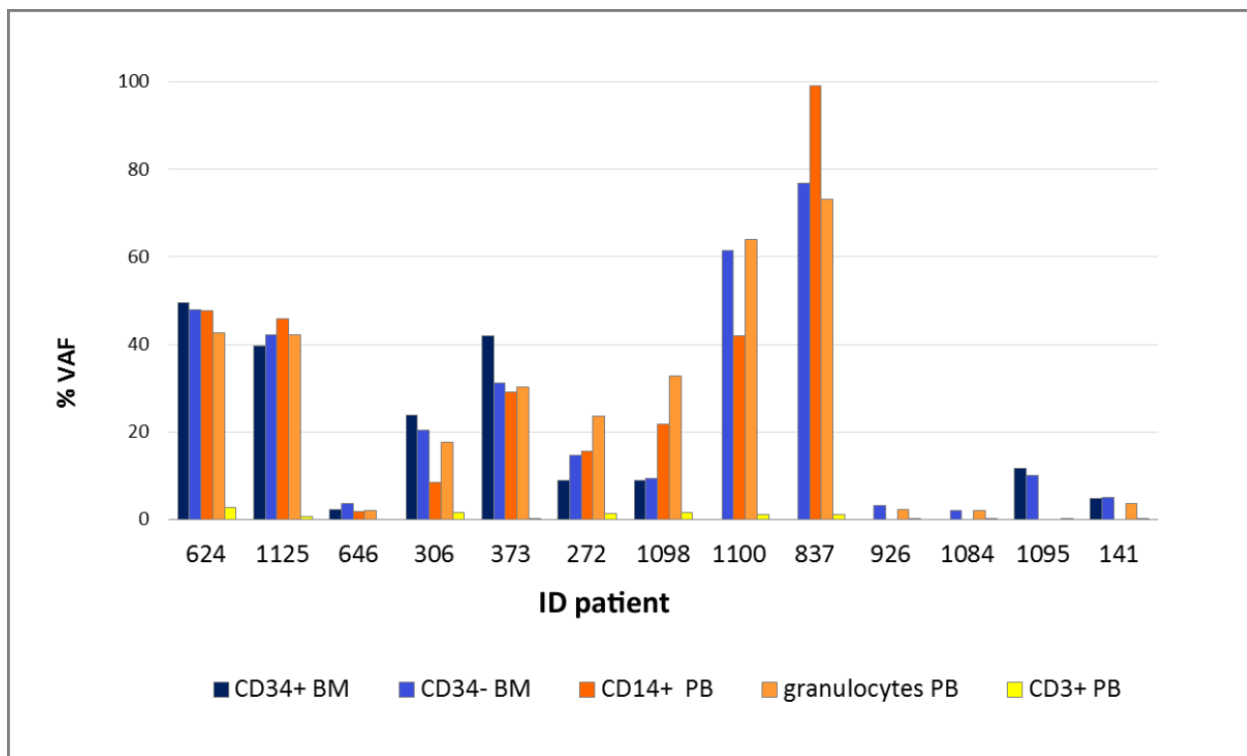


Obr. č. 9. Distribuce typů mutací v genu *TP53*.

TP53 mutace v různých buněčných liniích

Dále byla stanovena alelická frekvence mutací u různých typů buněk (Obrázek č. 10). CD3⁺ T-buňky byly použity jako kontroly pro rozlišení mutace zárodečné od somatické. Slabé % VAF detekované v těchto buňkách bylo pravděpodobně způsobené kontaminací mutovaných buněk v izolované frakci. Výsledky ukazují, že všechny zjištěné mutace v genu

TP53 jsou somatické. Mezi jednotlivými typy buněk KD a PK (CD34 +, CD34-, CD14 + a granulocyty) byl spočítán korelační koeficient za použití Pearsonova korelačního testu (rozmezí: $r=0.833-0.933$) (Tabulka č. 10).



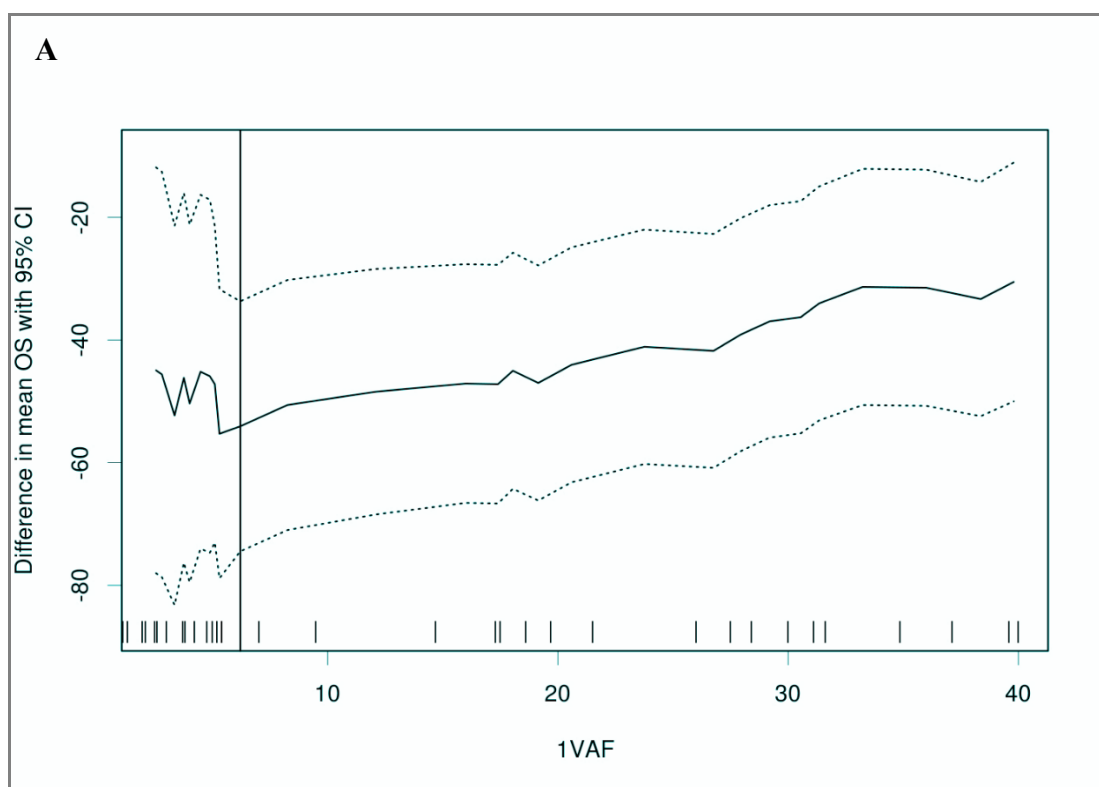
Obrázek č. 10. Alelická frekvence mutací v různých typech buněk. Každý sloupec představuje variantní alelickou frekvenci (VAF) dané mutace v různých typech buněk. CD34 + a CD34- buňky byly izolovány z kostní dřeně a CD14 + monocyty, CD3 + T lymfocyty a granulocyty byly izolovány z periferní krve.

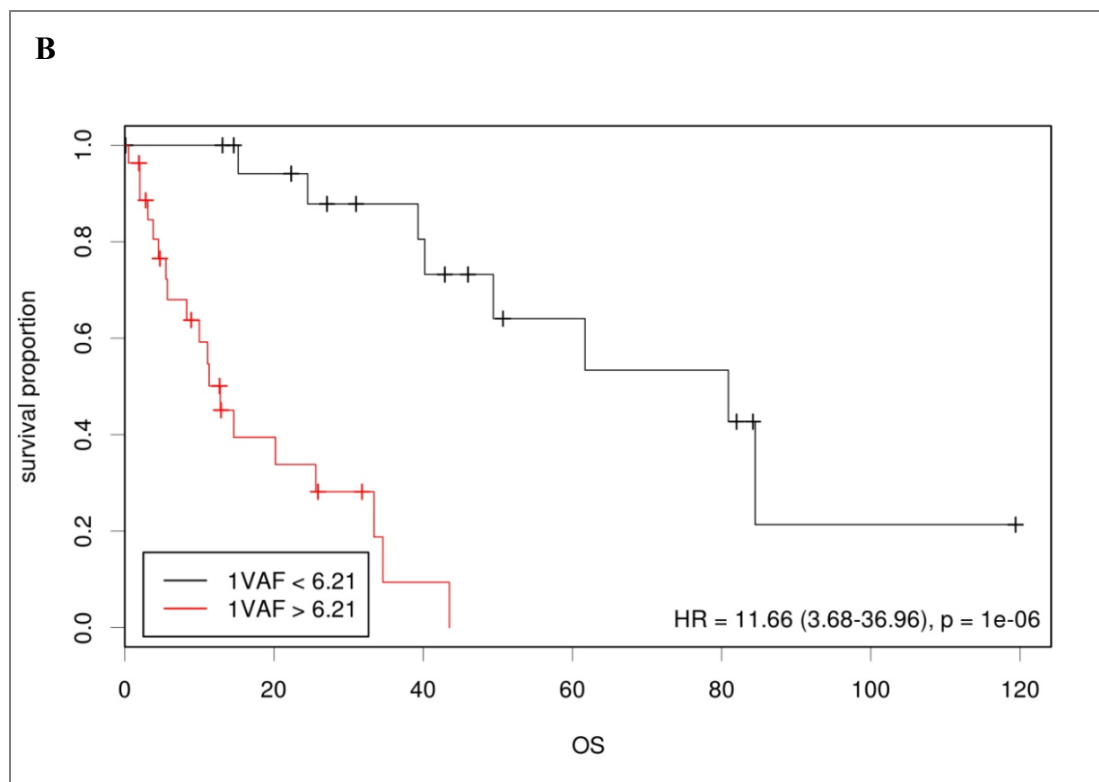
	CD34 +	CD34 -	CD14+	Granulocytes
CD34 +	1	0.933**	0.857*	0.833*
CD34 -	0.933**	1	0.883**	0.930**
CD14+	0.857*	0.883**	1	0.933**
Granulocyte	0.833*	0.930**	0.933**	1

Tabulka č. 10. Korelace variantní alelické frekvence mezi různými typy buněk.

Rozdělení pacientů podle velikosti mutovaného klonu a doby první detekce

Pomocí webového nástroje Cutoff Finder (<http://molpath.charite.de/cutoff/>) byla stanovena optimální hladina VAF, která rozdělila pacienty podle délky celkového přežití do několika skupin. Tato hladina byla stanovena na 6,21 % VAF (HR 14.36, 95% CI: 3.08–66.91; $p=3.7E-5$) (Obrázek č. 11). Podle této hladiny byli pacienti s mutací rozděleni do tří skupin podle velikosti mutovaného klonu a doby, kdy se u nich poprvé objevila mutace. První skupinu tvořili pacienti, u nichž *TP53* mutace byla přítomna již v době diagnózy a ve větším % buněk ($> 6\%$ VAF). Tuto skupinu tvořilo 35% pacientů. Druhou skupinu reprezentovalo 35% pacientů a mutace byla diagnostikována také již v době diagnózy, ale pouze v malém počtu buněk ($< 6\%$ VAF). Poslední skupinu tvořilo 25% pacientů, u nichž mutace byla detekována až v průběhu onemocnění, v průměru 31,4 měsíce od stanovení diagnózy (rozmezí: 18.6–48 měsíců). Pouze jednoho pacienta s mutací jsme nemohli hodnotit, protože vzorek nebyl v době diagnózy dostupný. První dostupný vzorek byl až 8,75 roků od stanovení diagnózy, a to byla detekována sestříhová mutace s 1,61% VAF.





Obrázek č. 11. Stanovení optimálního cut-off variantní alelické frekvence (VAF) s použitím analýzy významu přežití (long-rank test). (A) Asociace celkového přežití (OS) s VAF; (B), Kaplan-Meierova analýza VAF s použitím optimálního cut-off z obrázku 11A.

Univariantní analýza

Byla provedena jednorozměrná analýza OS a PFS k následujícím proměnným: věk, pohlaví, % blastů v KD, hodnota hemoglobinu a neutrofilů, počtu krevních destiček, IPSS, IPSS-R, del(5q) a mutace v genu *TP53*. Jako významné prediktory OS byly stanoveny: pohlaví ($p = 0,001$) a krevní destičky ($p = 0,017$). Pohlaví ($p = 0,001$), počet destiček ($p = 0,003$) a přítomnost mutace v genu *TP53* ($p = 0,037$) byly prediktory pro PFS. Podrobnosti o univariantní analýze jsou uvedeny v tabulce č. 11.

	OS			PFS		
	P	HR	95% CI	P	HR	95% CI
Věk (<65 let vs. ≥ 65)	0.097	1.611	0.918-2.828	0.069	1.615	0.964-2.704
Pohlaví (ženy vs. muži)	0.001	2.612	1.492-4.574	0.001	2.448	1.466-4.087
Blasty KD (≤2% vs. >2%)	0.211	1.416	0.821-2.441	0.391	1.242	0.757-2.039
Hemoglobin (<100 g/l vs. ≥ 100 g/l)	0.595	1.186	0.633-2.223	0.543	0.846	0.493-1.451
Neutrofily (<1.8 10 ⁹ /l vs. ≥ 1.8 10 ⁹ /l)	0.706	1.111	0.642-1.924	0.854	1.073	0.507-2.269
Destičky (<100 10 ⁹ /l vs. ≥100 10 ⁹ /l)	0.017	0.793	0.275-0.883	0.003	0.449	0.264-0.762
Karyotyp (Normalní vs. abnormální)	0.850	1.056	0.601-1.855	0.526	1.186	0.701-2.005
Karyotyp podle del(5q)	0.315	0.748	0.425-1.318	0.538	0.853	0.513-1.417
IPSS (nízké vs. střední)	0.321	1.332	0.757-2.343	0.310	1.306	0.780-2.189
IPSS-R (velmi nízké, nízké vs. střední, vysoké)	0.697	1.118	0.637-1.961	0.289	1.315	0.793-2.180
TP53 mutace (mut vs. WT)	0.086	1.767	0.922-3.388	0.033	2.220	1.065-4.626

Tabulka č.11. Jednorozměrná analýza celkového přežití (OS) a přežití bez progresu (PFS).

Zkratky: HR, poměr rizik; CI, konfidenční interval

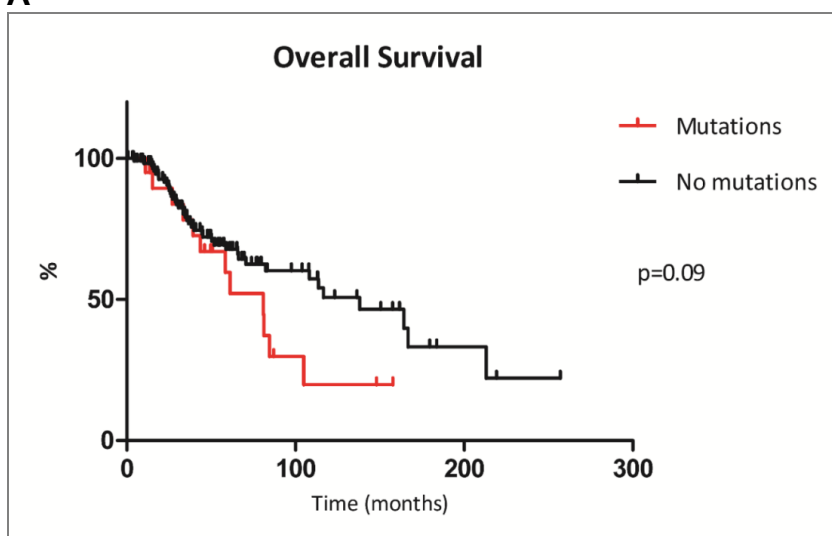
Tučné písmo označuje statisticky signifikantní hodnoty (P hodnoty).

Analýza prognostického vlivu *TP53* mutací na OS neodhalila žádné významné rozdíly v přežití mezi pacienty bez mutace a s mutací bez ohledu na velikost mutovaného klonu a doby detekce. Medián OS byl 138 měsíců ve skupině pacientů bez mutace a 80,9 měsíců ve skupině s mutací ($p = 0,09$) (Obrázek č. 12A). Podrobnější analýza prognostického vlivu mutací, tzn. rozdělení pacientů do 3 skupin popsanych výše, výrazně změnila křivky přežití (Obrázek č. 12B). První skupina pacientů s mutací detekovanou v době diagnózy s VAF > 6% (průměrná VAF: 43,4%; rozmezí: 23,9 až 76,8%) měla významně kratší OS 43,5 měsíců ve srovnání se skupinou bez mutace se 138 měsíci ($p = 0,003$; HR 12.2, 95% CI: 2.34-63.49). Druhá skupina, která zahrnovala pacienty s mutací *TP53* detekovanou v době diagnózy s VAF <6% (průměrná VAF: 2,1%; rozmezí: 0,3 až 4,7%), a třetí skupina zahrnovala pacienty, kteří získali mutaci v průběhu onemocnění (průměr: 31,4 měsíců po stanovení diagnózy), nevykázali významné změny v OS ($p = 0,77$ a $p = 0,99$).

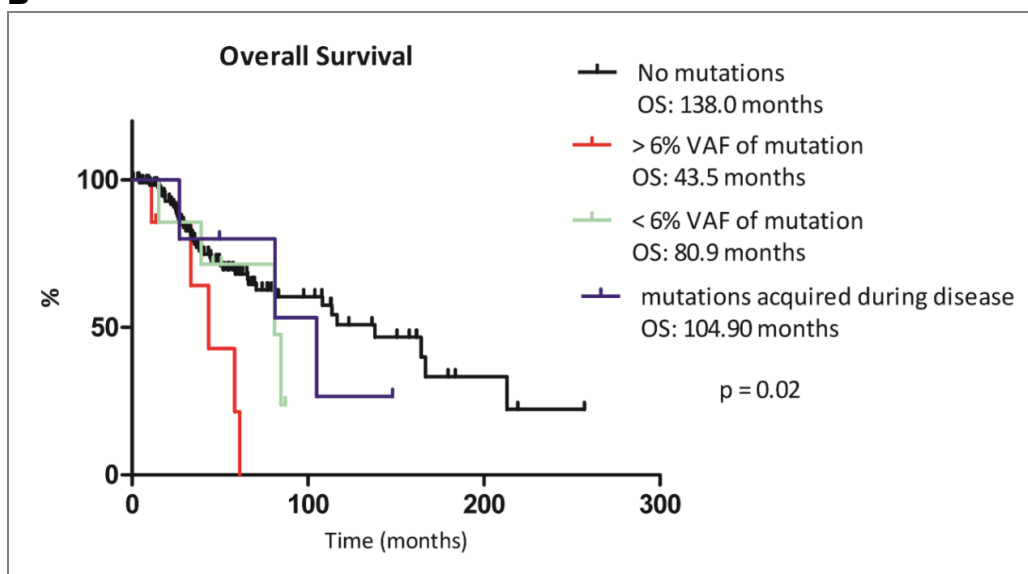
Dále jsme analyzovali PFS podle mutačního statusu genu *TP53* s použitím Kaplan-Meierovy analýzy. Pacienti s mutací měli signifikantně kratší PFS ve srovnání s pacienty bez mutace (medián: 54,2 vs. 116,6 měsíce; $p = 0,033$; HR = 2,22, 95% CI: 1,07-4,63), bez

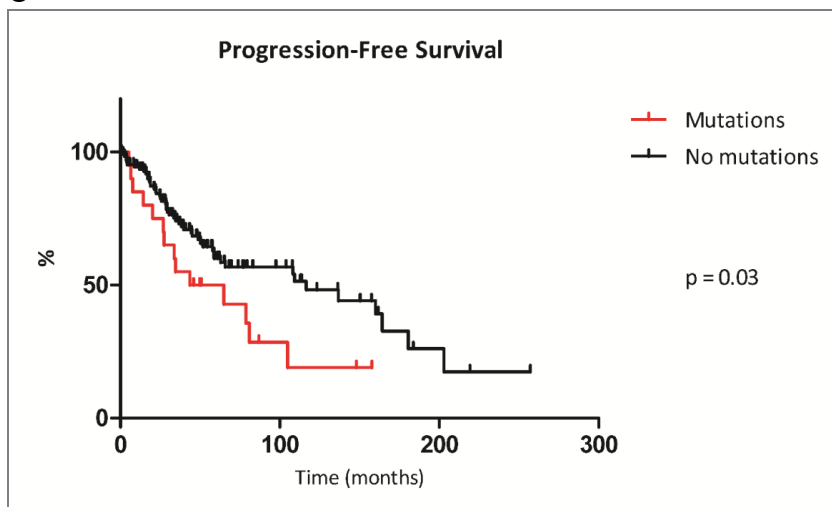
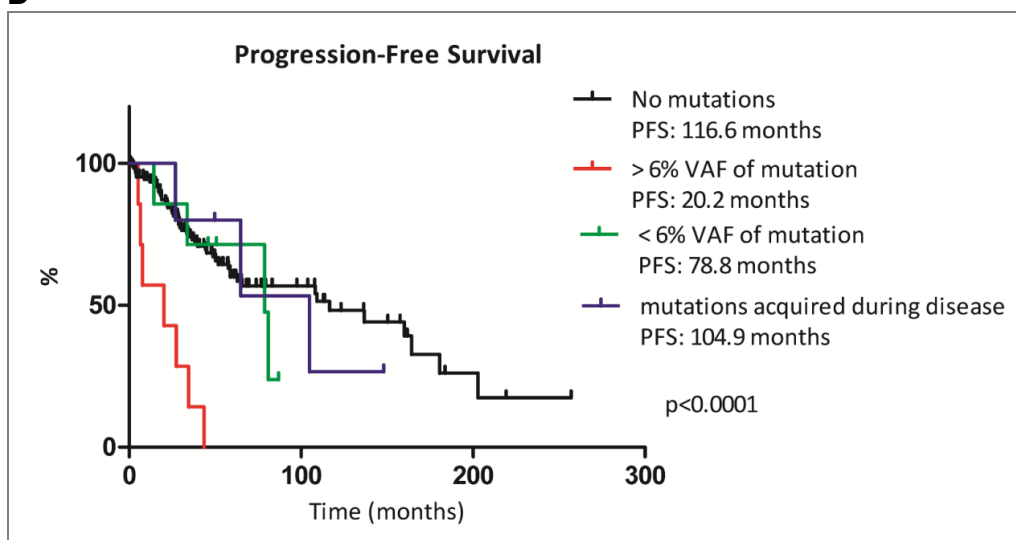
ohledu na velikost mutovaného klonu a času první detekce (Obrázek č.12C). PFS se významně změnilo, pokud byli pacienti rozděleni do 3 skupin popsanych výše. PFS se rapidně snížil ve skupině pacientů s mutací detekovanou v době diagnózy a s VAF > 6% na 20,2 měsíce (Obrázek č. 12D) oproti 116,6 měsíců ve skupině bez mutace ($p < 0,0001$, HR = 79,46, 95% CI: 14,17 až 445,6). Ve skupině pacientů s mutací identifikovanou v době diagnózy a VAF < 6% a ve skupině pacientů, kteří získali mutace v průběhu onemocnění, jsme nezjistili žádné významné změny v PFS ($p = 0,53$ a $p = 0,79$).

A



B



C**D**

Obrázek č. 12. Celkové přežití (OS) a přežití bez progresu (PFS) podle mutačního statusu *TP53*. (A, C) Celá kohorta pacientů, (B, D), pacienti rozdělení podle mutační zátěže a doby první detekce do čtyř skupin. (první skupina: pacienti bez mutace, druhá skupina: pacientů $>6\%$ VAF stanovené v době diagnózy, třetí skupina: pacienti s $<6\%$ VAF stanovené v době diagnózy, čtvrtá skupina: pacienti, kteří získali mutace v průběhu onemocnění).

Multivariantní analýza

Byl použit Coxův regresní model proporcionálních rizik pro stanovení vlivu každé proměnné vzhledem k OS a PFS (Tabulka č.12). Proměnné zahrnovaly: věk, pohlaví, % blastů v KD, hemoglobin, neutrofily, počet krevních destiček, karyotyp, del(5q), rizikové skupiny IPSS, IPSS-R a *TP53* mutace. Multivariantní analýzou bylo zjištěno, že *TP53* mutace

(HR 4,389, 95% CI: 1,842 - 10,455, $p = 0,001$), počet destiček (HR 0,451, 95% CI: 0,214-0,951; $p = 0,036$) a pohlaví (HR 2,777, 95% CI: 1,404-5,494; $p = 0,003$) jsou statisticky významné pro OS. *TP53* mutace (HR 3,743, 95% CI: 1,741-8,044; $p = 0,001$), pohlaví (HR 2,636, 95% CI: 1,409-4,930; $p = 0,002$) a počet krevních destiček (HR 0,386 95% CI: 0,198 až 0,752; $p = 0,005$) jsou statisticky významné pro PFS.

	OS			PFS		
	P	HR	95% CI	P	HR	95% CI
Věk (<65 yr. vs. ≥ 65)	0.122	1.028	0.993-1.063	0.115	1.023	0.994-1.053
Pohlaví (ženy vs. muži)	0.003	2.777	1.404-5.494	0.002	2.636	1.409-4.930
Blasty kostní dřevě (≤2% vs. >2%)	0.306	1.413	0.729-2.737	0.969	1.012	0.563-1.817
Hemoglobin (<100 g/l vs. ≥ 100 g/l)	0.137	1.867	0.820-4.252	0.902	1.047	0.507-2.163
Neutrofily (<1.8 10 ⁹ /l vs. ≥ 1.8 10 ⁹ /l)	0.171	1.607	0.815-3.169	0.249	1.441	0.775-2.678
Destičky (<100 10 ⁹ /l vs. ≥100 10 ⁹ /l)	0.036	0.451	0.214-0.951	0.005	0.386	0.198-0.752
Karyotyp (Normal vs. abnormal)	0.110	1.993	0.855-4.645	0.091	1.958	0.897-4.274
Karyotype podle del(5q)	0.081	0.440	0.175-1.106	0.399	0.701	0.307-1.601
IPSS (nízké vs. střední)	0.781	0.884	0.371-2.108	0.704	0.856	0.382-1.914
IPSS-R (velmi nízké, nízké vs. střední, vysoké)	0.456	0.760	0.370-1.563	0.728	1.130	0.567-2.253
<i>TP53</i> mutace (mut vs. WT)	0.001	4.389	1.842-10.455	0.001	3.743	1.741-8.044

Tabulka č.12. Multivariantní analýza pro celkové přežití (OS) a přežití bez progresu (PFS).

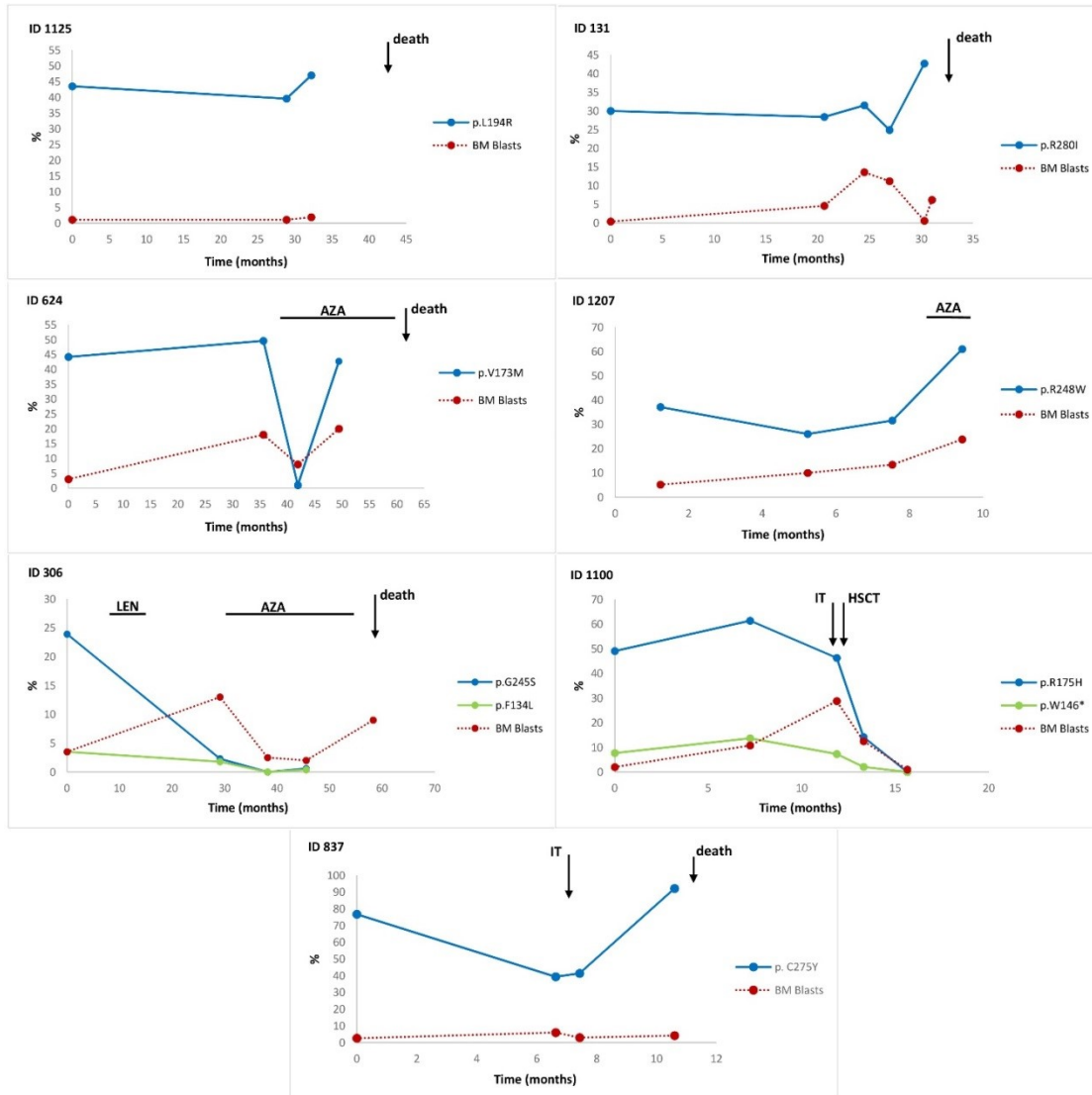
Zkratky: HR, poměr rizik; CI, konfidenční interval

Tučné písmo označuje statisticky signifikantní hodnoty (P hodnoty).

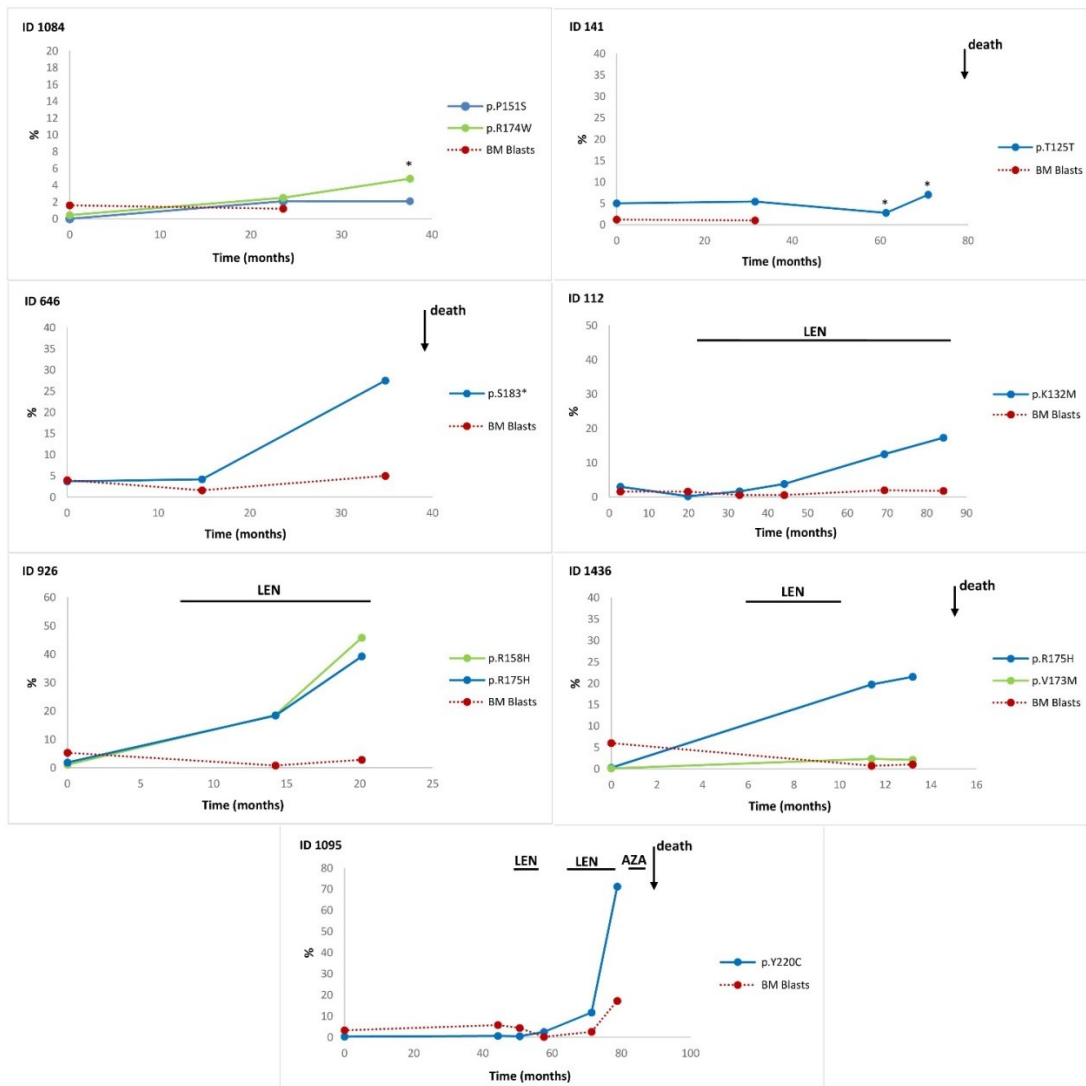
TP53 mutace v průběhu nemoci a vliv léčby

Všichni pacienti, u kterých byla detekována mutace, byli longitudinálně sledováni po celou délku trvání choroby. Sledování jednotlivých pacientů rozdělených do 3 skupin dle kritérií popsaných výše se nachází na obrázku číslo 13A až 13C.

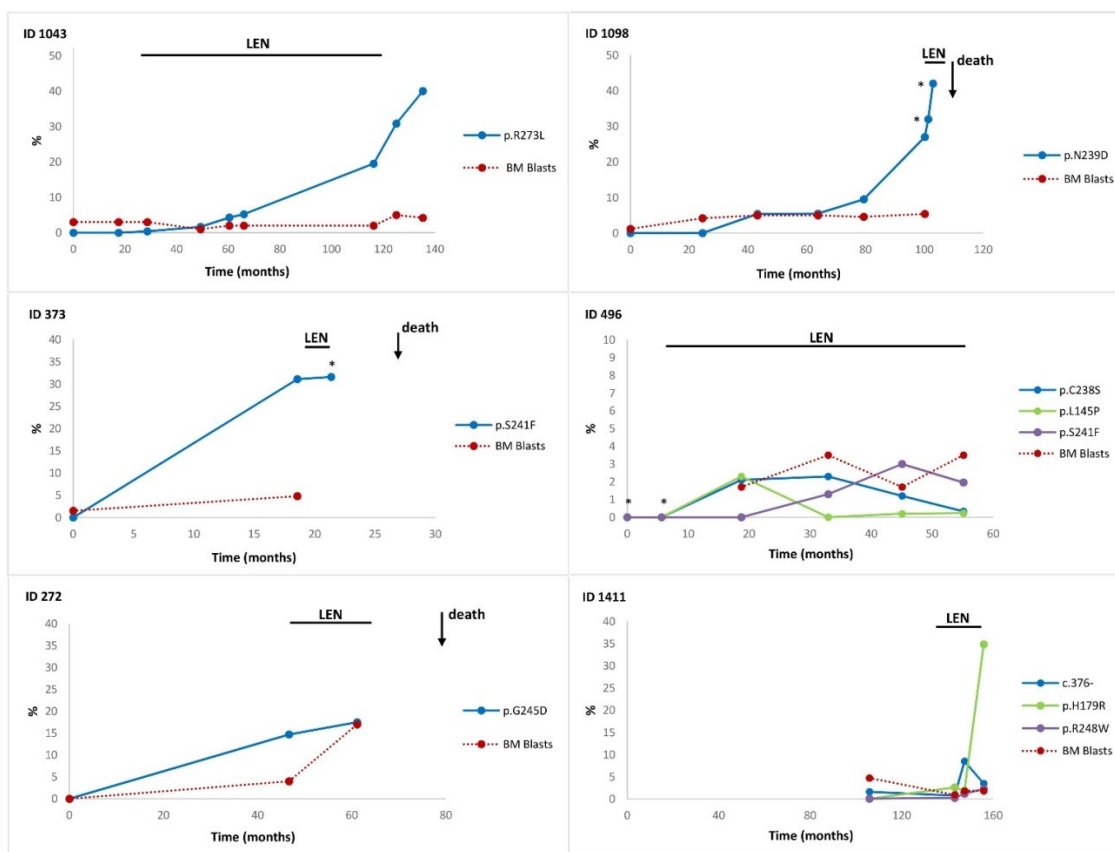
A



B



C



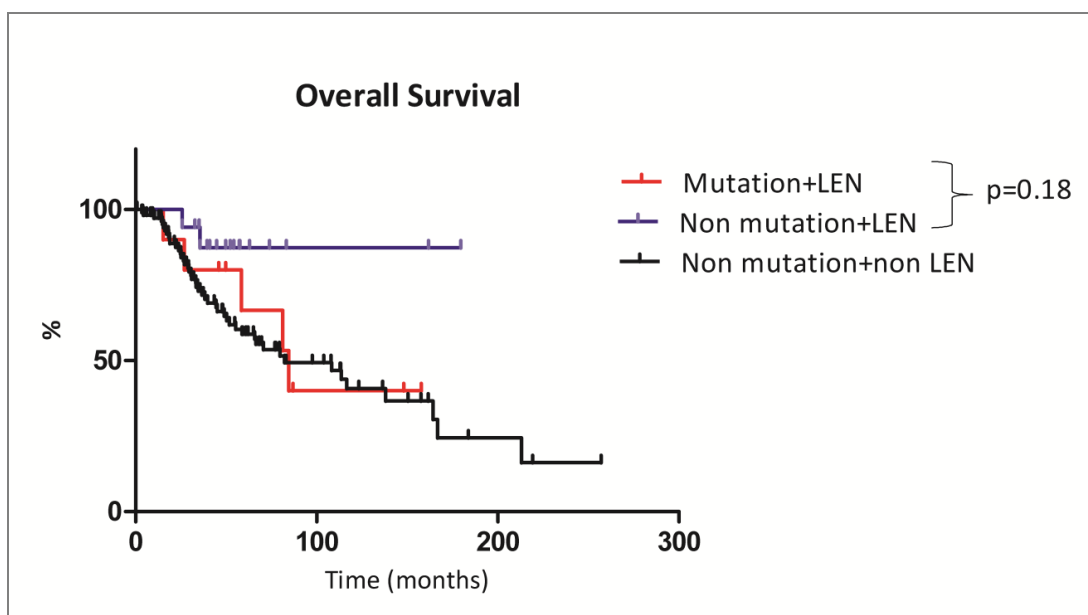
Obrázek č. 13. Mutační zátěž u jednotlivých pacientů v průběhu nemoci. A) Skupina pacientů s mutací >6% VAF v době diagnózy. B) Skupina pacientů s mutací <6% VAF v době diagnózy. C) Pacienti, kteří získali mutaci v průběhu nemoci.

Zkratky: LEN, léčba lenalidomidem; AZA, léčba 5-azacytidinem; IT, indukční terapie; HSCT, transplantace kostní dřeně; *, Vyšetření prováděné z periferní krve; %, % variantní alelické frekvence.

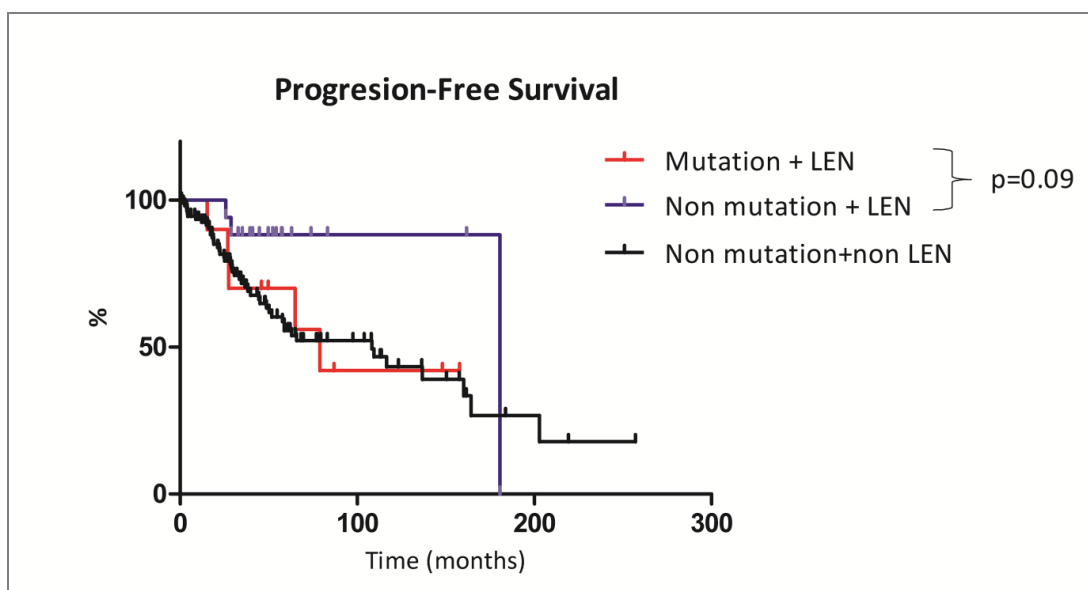
Pacienti léčeni lenalidomidem s a bez mutace TP53

U pacientů, kteří podstoupili léčbu lenalidomidem (lenalidomid podáván nejméně po dobu 4 měsíců), byla provedena analýza OS a PFS mezi skupinami pacientů s a bez mutace *TP53*. Analýzou nebyly zjištěny signifikantní rozdíly mezi skupinami, pro OS ($p=0,18$) a pro PFS ($p=0,09$). (Obrázek č.14).

A



B



Obrázek č.14. A) Celkové přežití a B) přežití bez progresu u pacientů s a bez mutace *TP53* léčených lenalidomidem (LEN).

4.2 Predikce odpovědi na hypometylační léčbu

4.2.1 Klinický soubor

V této studii byly vyšetřeny CD34⁺ hematopoetické pluripotentní buňky od 32 pacientů léčených azacitidinem (AZA) a 10 zdravých kontrol. 19 pacientů bylo s diagnózou MDS, 3 pacienti s CMML a 10 s AML s myelodysplasií příbuznými změnami (AML-MRC). Diagnózy byly stanoveny podle WHO klasifikace. Vzorky byly odebrány při rutinních vyšetřeních s informovaným souhlasem na Klinice hematologie 1. Interní kliniky VFN a Ústavu hematologie a krevní transfúze v Praze. Medián věku pacientů byl 68 let s rozsahem od 22 do 85 let. Medián věku kontrol byl 67 let s rozsahem od 21 do 80 let. Charakteristika pacientů je v tabulce č. 13. Azacitidin byl podáván podle doporučení a to 75mg/m² denně po dobu 7 dnů každých 28 dnů. Medián podávaných cyklů léčby azacitidinem byl 13 s rozmezím od 3 do 32 cyklů. Odpověď byla hodnocena podle kritéria mezinárodní pracovní skupiny (IWG) pro MDS (Cheson BD et al., 2006) a AML (Cheson BD et al., 2003). Jako pacienti reagující na léčbu jsou považováni ti, kteří dosáhnou kompletní remise (CR), parciální remise (PR), kompletní remise ve dřeni (mCR) nebo hematologické zlepšení (HI). Jako pacienti nereagující na léčbu jsou považováni ti, kteří vykazují stabilitu nemoci (SD) a progresi nemoci (PD).

Charakteristika	
Počet pacientů	32
Pohlaví	
Muži	18 (56%)
Ženy	14 (44%)
Věk, median (rozmezí)	68 (22-85)
Počet blastů, median (rozmezí) (%)	17.6 (4-30)
Diagnóza	
RCMD	1 (3%)
RAEB 1	3 (9%)
RAEB 2	15 (47%)
CMML	3 (9%)
AML with MRC	10 (31%)
IPSS	
Střední-1	2 (6%)
Střední-2	12 (38%)
Vysoké	18 (56%)
Karyotyp	
Normální	9
Abnormální	19
NA	4

Tabulka č. 13. Základní charakteristika pacientů léčených azacitidinem.

Zkratky: RCMD, refrakterní cytopenie s multilineární dysplázií; RAEB 1, refrakterní anémie s přebytkem blastů-1; RAEB 2, refrakterní anémie s přebytkem blastů-2; CMML, chronická myelomonocytární leukémie; AML s MRC, akutní myeloidní leukémie se změnami souvisejícími s myelodysplázií; NA: Není k dispozici

4.2.2 Metody

Buněčná separace

K separaci mononukleárních od polymorfonukleárních buněk byla zvolena metoda gradientové centrifugace s roztokem Ficoll-Hypaque (GE Healthcare). CD 34+ buňky byly separovány pomocí imuno-magnetické separace na základě povrchových markerů buněk (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany).

Izolace nukleových kyselin

Celková RNA byla izolována pomocí guanidin-thiokyanát-fenol-chloroformové metody. Navíc byly vzorky inkubovány s DNázy I (Qiagen), aby se zabránilo kontaminaci genomové DNA. Koncentrace byla měřena na Nanodropu a s použitím fluorimetru Qubit. Kontrola kvality byla měřena na elektroforetickém přístroji 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies) a byl spočítán RIN (RNA Integrity Number) příslušné RNA.

Microarray analýzy

HumanHT-12 V4 Expression BeadChip (Illumina, San Diego, CA) byl použit pro vytvoření profilů mRNA exprese. 200ng celkové RNA byla reverzně transkribována a následně použita jako matrice pro *in vitro* transkripci s použitím Illumina TotalPrep RNA Amplification Kitu. Biotinylovaná cRNA (750 ng) byla hybridizována na mikročip po dobu 16 hodin při 68 °C.

Real-time PCR

Kvantitativní PCR v reálném čase byla použita pro ověření expresních dat z microarray analýz. Byly použity validované TaqMan Assays pro 3 vybrané geny (*RPL28*, *RPL32* a *EVI2B*), každý vzorek byl analyzován v duplikátu. Pro vyhodnocení byla použita metoda $\Delta\Delta CT$ (Livak KJ et al., 2001).

Statistické analýzy

OS bylo definováno jako doba od zahájení léčby azacitidinem až do úmrtí z jakékoli příčiny. Pacienti, kteří zůstali naživu, byli cenzurováni v době posledního sledování. Kaplan-Meierova analýza byla použita pro stanovení křivek přežití. Statistické analýzy byly provedeny pomocí GraphPad Prism 4. Expresní hodnoty byly nejdříve normalizovány za použití kvantilové normalizace. Nepárový neparametrický test (Mann-Whitney) byl použit pro porovnání hladin exprese. Dendrogram byl sestaven pomocí softwaru MeV, MultiExperiment Viewer, verze 4.9.0.

4.2.3 Výsledky

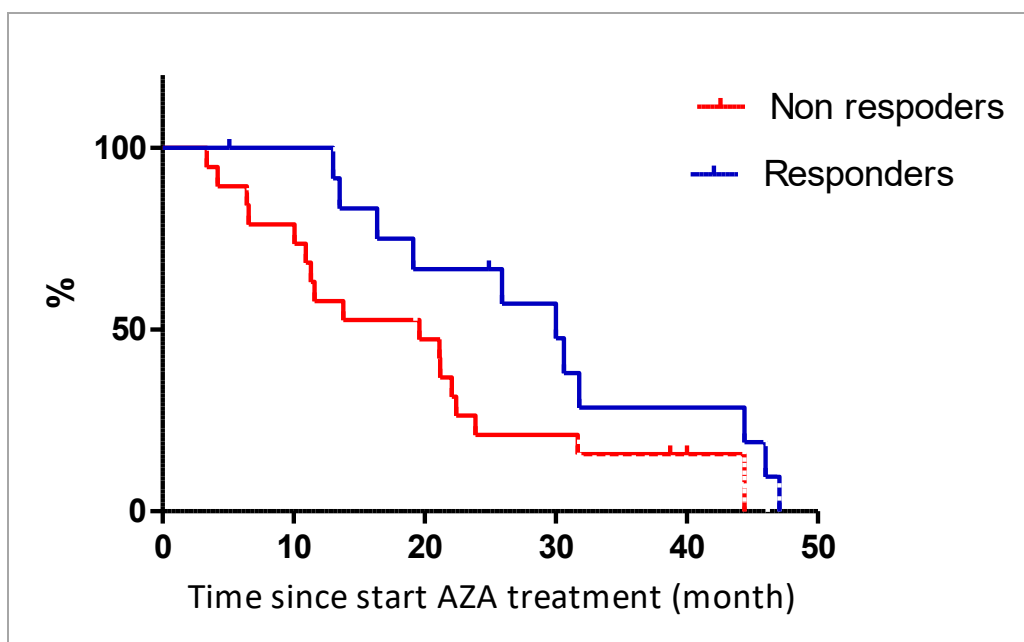
Charakteristika odpovědi pacientů na léčbu

Charakteristika odpovědi pacientů na léčbu v tabulce č. 14. Ve studii byly zpracovány vzorky od 32 pacientů, kteří postoupili léčbu azacitidinem. Odpověď léčby byla hodnocena mezi 3 až 8 cyklem. Devět pacientů (28,1%) progredovalo, 10 (31,3%) mělo onemocnění beze změn a 13 (40,6%) pacientů dosáhlo kompletní či částečné odpovědi na léčbu. Křivky přežití jsou na obrázku č. 15.

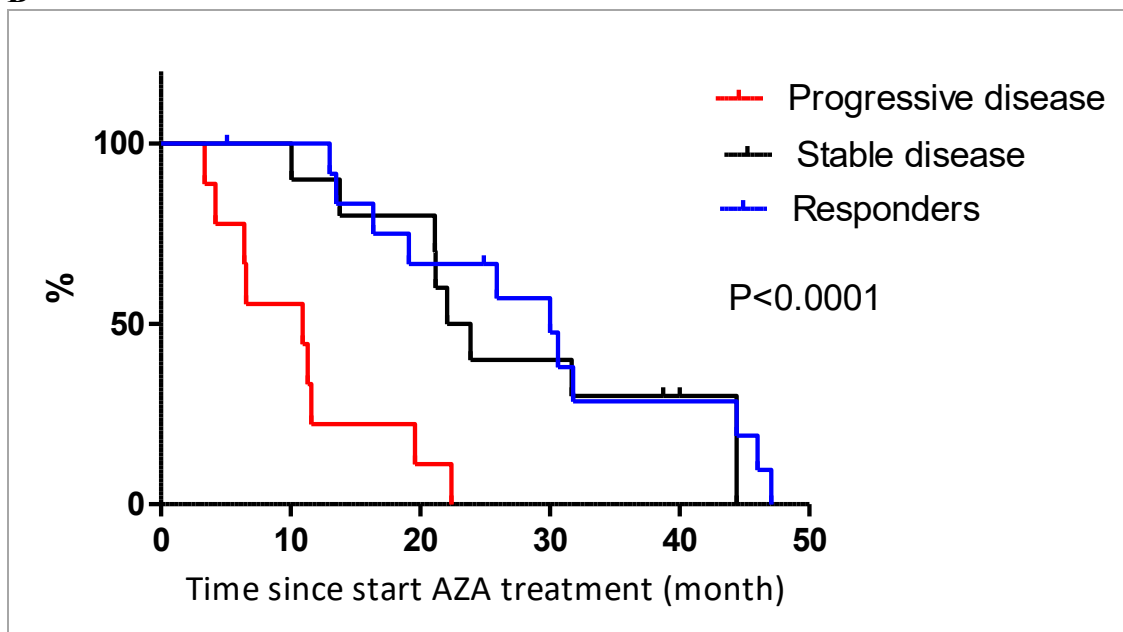
	Celkem, n=32		
	n	%	Skupiny
Kompletní odpověď	6	18.8	Reagující na léčbu (40.6 %)
Částečná odpověď	5	15.6	
Hematologické zlepšení	1	3.1	
Kompletní odpověď KD	1	3.1	
Stabilní onemocnění	10	31.3	Nereagující na léčbu (59.4 %)
Progrese onemocnění	9	28.1	

Tabulka č. 14. Odpověď pacientů na léčbu azacitidinem podle IWG kritérií.

A



B



Obrázek č. 15. Kaplan-Maierovy křivky přežití. (A) Mezi pacienty s odpovědí a bez odpovědi na léčbu. (B) Mezi pacienty s odpovědí, onemocněním beze změny a progresí onemocnění.

Rozdílná genová exprese mezi pacienty s a bez odpovědi na léčbu azacitidinem před zahájením terapie

Expresní analýza byla provedena v CD34+ pluripotentních hematopoetických buňkách získaných od 32 pacientů před léčbou a 10 zdravých kontrol. Pacienti byli rozděleni na skupinu s a bez odpovědi na léčbu. Identifikovali jsme 52 odlišně exprimovaných genů ($p < 0,01$) mezi takto rozdělenými pacienty. Seznam genů byl anotován pomocí databáze DAVID <https://david.ncifcrf.gov/> (Tabulka č.15). Tyto deregulované geny byly podle funkční anotace zařazeny do následujících kategorií: „ribozomy“ (4 geny: *RPL32*, *RPL28*, *RPL31* a *MRPS10*), "vazba nukleotidů" (12 genů: *MKI67IP*, *NKIRAS1*, *ACTG1*, *ACVR1B*, *GRHPR*, *MAST3*, *ACAD11*, *PPP2R4*, *PDK3*, *SLC27A3*, *TUBB6* a *VAR5*) a "mitochondrie" (7 genů: *MRPS10*, *NIT2*, *PDK3*, *SLC25A37*, *SLC27A3*, *TMLHE* a *VAR5*). V databázi KEGG PATHWAY byly zjištěny tyto deregulované signální dráhy: ribozom ($p = 0,02$; *RPL28*, *RPL31* a *RPL32*), a Wnt ($p = 0,05$; *FRAT2*, *PPP2R5D* a *TBL1X*).

GenBank Accession No.	Gene Symbol	Chromosome
NM_001614.2	ACTG1	17
NM_000993.2	RPL31	2
NM_153326.1	AKR1A1	1
NM_174896.2	C1orf162	1
XM_941691.1	DUSP22	6
NM_032390.3	MKI67IP	2
NM_006495.2	EV12B	17
NM_018141.2	MRPS10	6
NM_018224.2	C7orf44	7
NM_012083.2	FRAT2	10
NM_006295.1	VAR5	6
NM_014268.1	MAPRE2	18
NM_015213.2	DENND5A	11
NM_144649.1	TMEM71	8
NM_144638.1	TMEM42	3
NM_178000.1	PPP2R4	9
NM_015463.2	CNRIP1	2
NR_001434.1	HLA-H	6
NM_024330.1	SLC27A3	1
NM_205837.1	LST1	6
NM_016612.1	SLC25A37	8
NM_032169.3	ACAD11	3
NM_153615.1	RGL4	22
NM_012203.1	GRHPR	9
NM_020202.2	NIT2	3
NM_004592.2	SFRS8	12

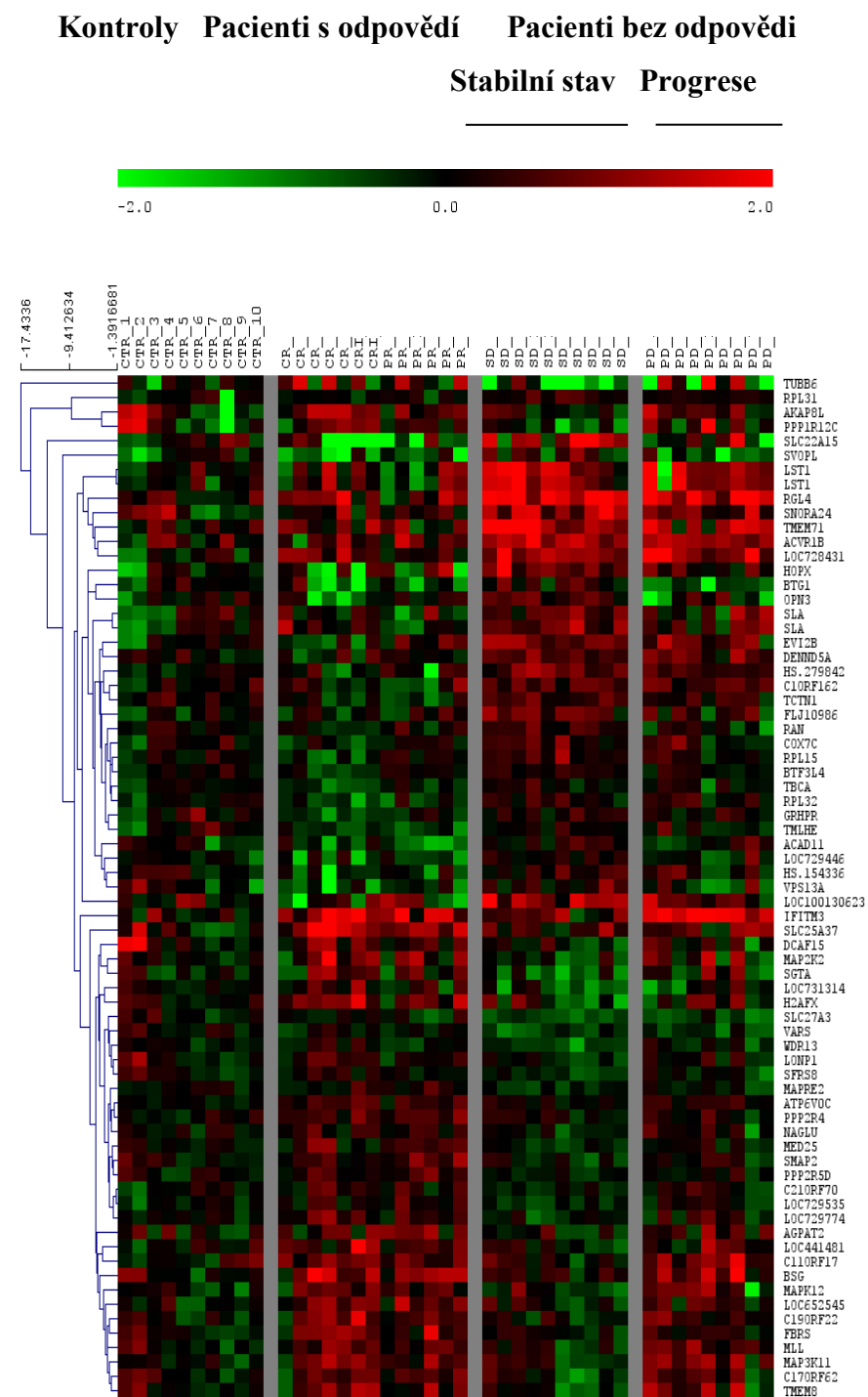
GenBank Accession No.	Gene Symbol	Chromosome
NM_004302.3	ACVR1B	12
NR_002963.1	SNORA24	4
NM_021626.1	SCPEP1	17
NM_001007073.1	RPL32	3
NM_000991.3	RPL28	19
XM_927769.1	LOC653506	17
NM_002105.2	H2AFX	11
NM_024549.3	TCTN1	12
XM_001132105.2	LOC728431	1
NM_022733.1	SMAP2	1
XM_938703.1	TMLHE	X
NM_005647.2	TBL1X	X
NM_030973.2	MED25	19
XM_946079.1	C7orf20	7
XM_001713846.1	LOC100130623	20
NM_180976.1	PPP2R5D	6
XM_942035.1	LOC652545	
XM_038150.5	MAST3	19
NM_018999.2	FAM190B	10
XM_001715883.1	LOC729535	
NM_015463.1	C2orf32	2
NM_018845.1	RAG1AP1	1
XM_940079.1	TUBB6	18
NM_020345.3	NKIRAS1	3
NM_005391.1	PDK3	X
NM_018420.1	SLC22A15	1

Tabulka č.15. Rozdílně exprimované geny mezi skupinou s odpovědí a bez odpovědi před zahájením léčby azacitidinem.

Rozdílná genová exprese mezi pacienty s odpovědí na léčbu a pacienty beze změny onemocnění před zahájením terapie

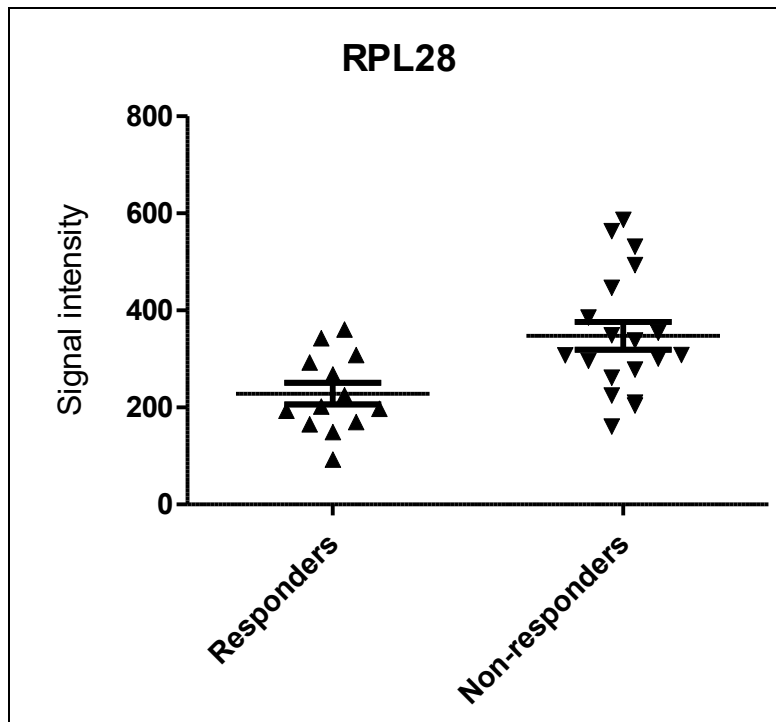
Bylo identifikováno 71 rozdílně exprimovaných genů. Nejčastěji zastoupené funkční kategorie mezi deregulovanými geny byly "ATP" (7 genů; *ATP6VOC*, *ACVR1B*, *LONPI*, *MAOK12*, *MAP2K2* a další), "protoonkogeny" (5 genů: *BTG1*, *HOPX*, *C11orf17*, *EVI2B*, *MLL*), a "buněčný cyklus" (7 genů: *H2AFX*, *RAN*, *ACVR1B*, *MAPRE2*, *MAPK12*, *MAP3K11*, *MLL*).“ Ribozomy“ ($p = 0,03$; *RPL15*, *RPL31*, *RPL32*) a „MAPK signální dráha“ ($p = 0,05$; *MAPK12*, *MAP3K11*, *MAP2K2*, *ACVR1B*) byly identifikovány jako deregulované dráhy. Heatmapa z hierarchické shlukové analýzy těchto genů je na obrázku č. 16.

Celkově bylo nalezeno mezi skupinami pacientů rozdělených podle odpovědi 5 rozdílně exprimovaných genů souvisejících s ribozomy (*RPL15*, *RPL28*, *RPL31*, *RPL32*, *MRPS10*, *MRPS21*) a 13 ribozomálních pseudogenů (*RPS26L*, *LOC650646*, *LOC402057*, *LOC648103*, *LOC44087*, *LOC646785*, *LOC392008*, *LOC100131572*, *LOC390578*, *LOC100129952*, *LOC441550*, *LOC442162*, *LOC650646*, *LOC642210*). Úroveň exprese některých vybraných genů je uvedena v obrázku č. 17. Byla nalezena korelace úrovně exprese ribozomálního genu *RPL28* a OS po podání azacitidinu (Obrázek č. 18).

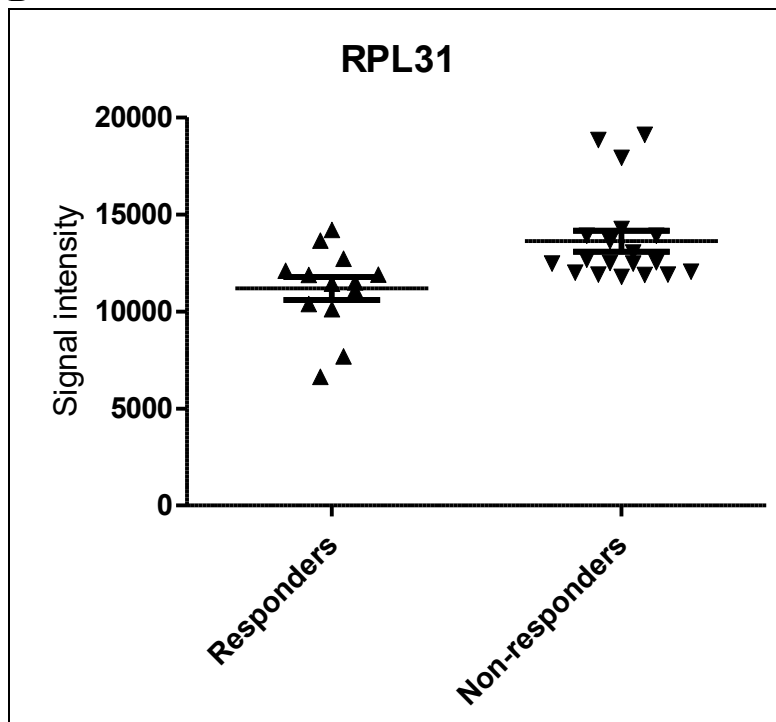


Obrázek č.16. Heatmapa 71 alterovaných genů mezi pacienty s odpovědí na léčbu a pacienty bez reakce (onemocnění beze změny).

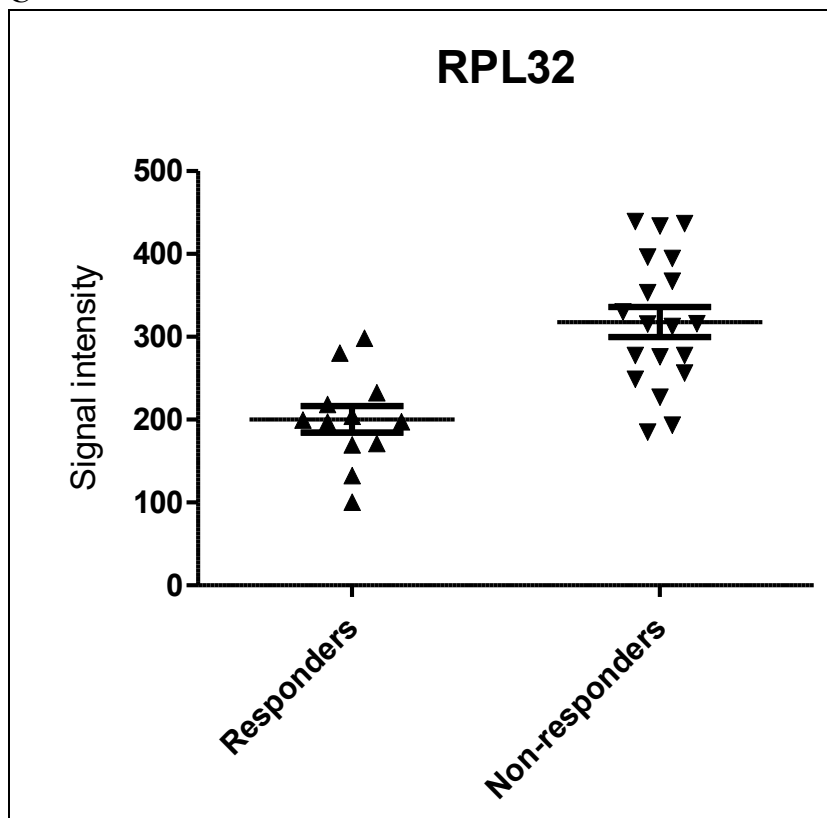
A



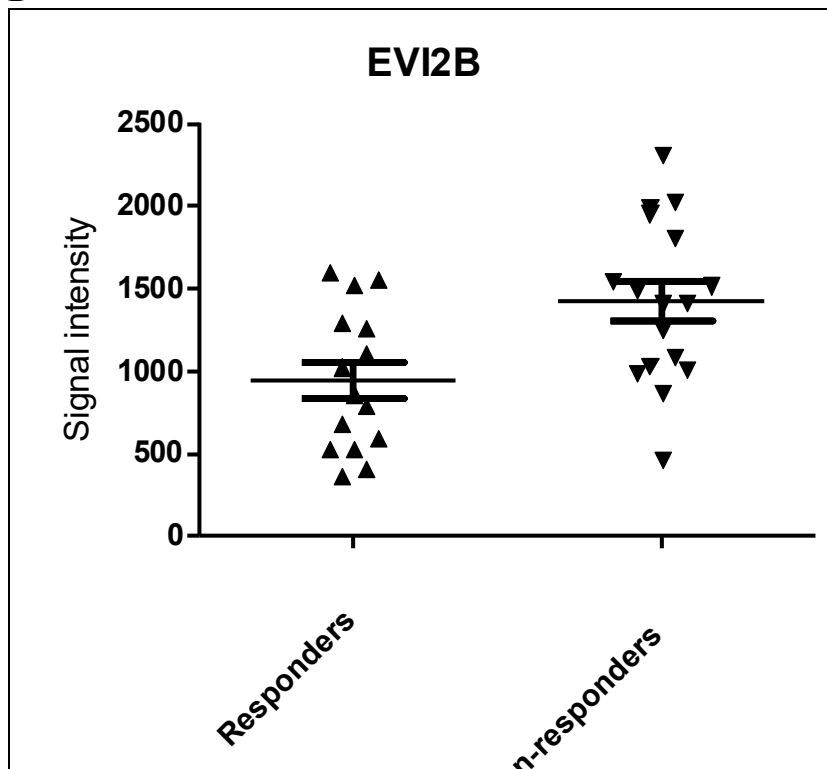
B



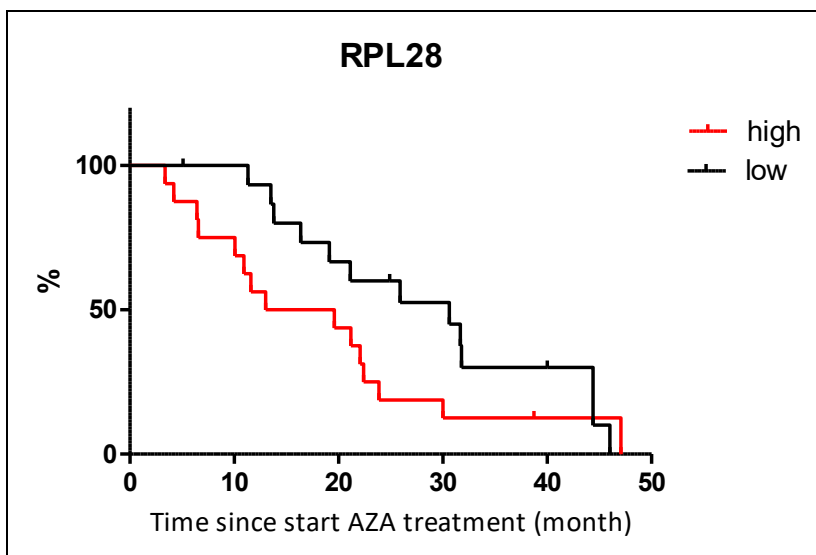
C



D



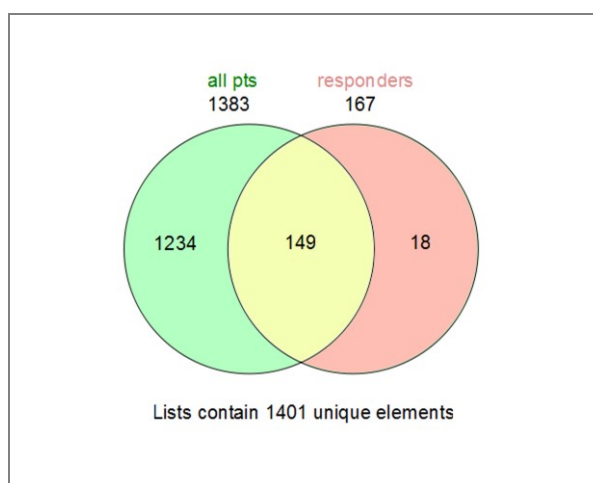
Obrázek č.17. Hladiny genové exprese vybraných genů v CD34+ buňkách responderů a neresponderů před léčbou azacitidinem. (A) *RPL28* ($p = 0,005$), (B) *RPL31* ($p = 0,006$), (C) *RPL32* ($p = 0,0001$) a (D) *EVI2B* ($p = 0,006$).



Obrázek č. 18. Kaplan-Maierovy křivky přežití pacientů léčených azacitidinem rozdělených podle úrovně exprese genu *RPL28* (černá křivka – nízká exprese, červená křivka – vysoká exprese).

Analýza genové exprese před a po léčbě azacitidinem

Porovnáním hodnot exprese u pacientů před a po léčbě byla zjištěna změna exprese 167 genů u pacientů s odpovědí, 26 genů u nereagujících pacientů se stabilní chorobou a 13 genů u pacientů bez odpovědi s progresí onemocnění. Vennův diagram (Obrázek č. 19) identifikoval 18 genů (*AGPAT2*, *ANKRD54*, *ELOVL1*, *FIZ1*, *FKBP2*, *GPR56*, *GRAMD4*, *HINT3*, *LOC93622*, *LPIN1*, *MLF2*, *MRPS18B*, *MYCN*, *PTK2*, *RAC3*, *RNASEH2C*, *LOC644511*, *SLC8A*; $p = 0,001$), u nichž došlo po léčbě k signifikantní změně exprese specificky u respondentů, ale ne u pacientů bez odpovědi. Tyto geny by mohly být kandidáty pro sledování odpovědi na léčbu.



Obrázek č. 19. Vennův diagram znázorňující počet deregulovaných genů po léčbě AZA u respondentů a u všech pacientů.

Validace výsledků z expresních mRNA mikročipů

Kvantitativní PCR byla použita pro ověření hladiny mRNA genů *RPL28*, *RPL32* a *EVI2B*. Vysoký korelační koeficient mezi daty z různých platforem (0,97, 0,82 a 0,99) prokazuje validitu získaných výsledků.

4.3 identifikace bodových polymorfismů asociovaných s MDS.

4.3.1 Klinický soubor

Profil SNPs byl sestaven se vzorků 198 pacientů s *de novo* MDS a AML-MRC a kontrolní skupinou sestávající se z 292 vzorků kavkazské populace. Vzorky byly odebírány s informovaným souhlasem na Ústavu hematologie a krevní transfuze a Klinice hematologie 1. Interní kliniky VFN v Praze. Medián věku pacientů byl 63 let (rozsah: 18-89 let) a medián věku kontrol 61 let (rozsah: 19-98 let). Ženy tvořily 69,7% skupiny pacientů a 65,4% kontrol. Diagnózy MDS byly založené na standardních diagnostických WHO kritériích. Charakteristika pacientů je uvedena v tabulce č. 16.

WHO klasifikace			
	N (%)	Blasty (%)	Cytogenetika, normal/abnormal
MDS del(5q)	24 (12.1)	2.8	0/24
RCUD	14 (7.1)	1.1	10/2
RARS	12 (6.1)	1.4	5/4
RCMD	59 (29.8)	1.6	36/17
RAEB-1	26 (13.1)	4.4	11/10
RAEB-2	25 (12.6)	12.5	10/9
MDS-U	3 (1.5)	2.0	3/0
MDS/MPS	23 (11.6)	8.3	12/7
AML s MRC	12 (6.1)	28.3	4/6
Věk (roky)			
Median (rozmezí)	63 (18-89)		
Pohlaví			
Muži (%)	60 (30.3)		
Ženy (%)	138 (69.7)		
Léčba (%)			
Pouze podpůrná	82(41.4)		
Chemoterapie	72 (36.4)		
SCT / SCT a chemoterapie	32 (16.2)		
Hypometylační	12 (6.1)		

Tabulka č. 16 : Základní charakteristika pacientů, u nichž byl stanoven profil SNP.

MDS del (5q): MDS spojené s izolovanou del(5q); RCUD: Refraktérní cytopenií s unilineární dysplasií; RARS: Refraktérní anémie s prstenčitými sideroblasty; RCMD: refraktérní cytopenií s multilineární dysplazií; RAEB-1: Refraktérní anémie s přebytkem blastů typu 1; RAEB-2: Refraktérní anémie s přebytkem blastů typu 2; MDS-U: MDS neklasifikovatelná; MDS / MPS: MDS a myeloproliferativní syndromy; AML s MRC: akutní myeloidní leukémie se změnami spojenými s myelodysplázií; SCT: Transplantace kmenových buněk

4.3.2 Metody

Izolace buněk a DNA

Pro sestavení SNPs profilu byly použity granulocyty pacientů a kontrol. Granulocyty byly získány rozdělením podle jejich hmotnostního gradientu pomocí Ficoll-Paque. DNA byla izolována modifikovanou metodou dle Millera, kdy krevní jaderné buňky se získají po hemolýze a jejich DNA je uvolněna po lýze jaderných membrán. Kontaminující proteiny jsou enzymaticky naštěpeny a odstraněny vysolením. DNA je z vodného prostředí získávána precipitací ethanolem.

Sestavení SNPs profilů-genotypování

Pro sestavení SNPs profilu jsme použili Cancer SNP Panel (Illumina Inc., USA), kde se nachází 1421 SNPs odvozených z 408 genů zapojených v karcinogenezi skrze např. apoptózu, onkogenezi, tumor supresorové geny a G proteiny. Polymorfismy byly vybrány z National Cancer Institute's Cancer Genome Anatomy Project SNP500Cancer Database. Detekované SNPs se nachází v intronech, v 5' a 3'- nepřekládané oblasti (UTR - untranslated region) i v kódující části genomu. Panel obsahuje v průměru 3 SNPs na každý zkoumaný gen. Výchozím materiálem byla DNA v množství 250ng. Tato technologie zahrnuje hybridizaci DNA vzorku s alel- a lokus- specifickými primery, následnou extenzi, ligaci a amplifikaci. Na závěr dochází k hybridizaci vzniklého produktu na destičku Sentrix Array Matrix pro analýzu 96 vzorků. Hybridizovaný produkt, který je značen Cy3 a Cy5, je skenován na přístroji BeadStation 500G od firmy Illumina. Genotypování bylo provedeno podle protokolu výrobce.

Vzhledem k značné variabilitě ve frekvenci výskytu jednotlivých alel v různých populacích, vytvořili jsme vlastní mapu frekvencí alel zkoumaných polymorfismů odpovídající zastoupení v české populaci.

Validace

Výsledky SNPs analýzy byly ověřeny u tří vybraných genů (*LIG1*, *RAD52*, *GPX3*) pomocí SNPs TaqManAssay (Life Technologies, USA). CD3+ a CD14+ buňky byly použity pro rozlišení zárodečného nebo somatického původu genotypu příslušné alely v *LIG1*, *RAD52* a *GPX3* genech u 68 pacientů.

Statistické analýzy

Hrubá data byla importována do GenomeStudio V2009.2(Illumina) pro shlukovací analýzy a kontrolu kvality genotypování. Výpočty byly provedeny v statistickém programovacím jazyku R (verze 2.12.0; R-project.org). Bylo vyřazeno celkem 35 vzorků s „call rate“ <90% a 15 SNP s „call rate“ <80%. Dále byly stanoveny odchylky od Hardy-Weinbergovy rovnováhy (HWE) v kontrolních vzorcích a dalších 22 SNPs s p hodnotou <3,56-05 (Bonferroni korekce pro mnohočetné testování: 0,05 / 1406) bylo vyloučeno. Takže do další analýzy vstoupilo 1384 SNPs a 455 vzorků. Byla použita korekce typu FDR (false-discovery rate) pro mnohočetné testování na 5% úrovni významu podle Benjamini-Hochberga. Při hodnocení byly použity následující statistické metody: Chí-kvadrát test, odds ratio (OR) - podíl šancí a 95 % interval spolehlivosti (CI). P-hodnoty

(oboustranný test) menší než 0,05 byly považovány za statisticky významné. Křivky přežití byly vytvořeny pomocí Kaplan-Meierovy metody a rozdíly mezi genotypy byly hodnoceny pomocí log-rank testu.

4.3.3 Výsledky

SNPs asociační studie

Analyzovali jsme 1 421 SNPs nacházejících se v 408 genech, které se určitým způsobem podílejí na karcinogenezi. Provedenou studií jsme detekovali devět bodových polymorfismů, které jsou asociovány s MDS ($p < 0,0002$). Čtyři z těchto kandidátních SNPs se nachází v genech, jejichž funkcí jsou opravy DNA či ochrana před oxidačním poškozením (*LIG1*, *RAD52*, *MSH3* a *GPX3*). Dále, dva z devíti kandidátních SNPs se nachází v genech transmembránových transportérů (*ABCB1* a *SLC4A2*). Souhrnná tabulka výsledků č. 17, č. 18 a č. 19. Dále bylo zjištěno, že genotyp genů *ROS1* (c-ros oncogene 1) a *STK6* (aurora kinase A) souvisí s celkovým přežitím pacientů MDS (Obrázek č. 20).

dbSNPs reference number	Gene	Gene region	Genotype	MAF controls	MAF patients	OR	95% confidence interval	P Value
rs13240966	SLC4A2	intron	C/G	0.4789	0.7074	2.63	1.86-3.40	4.98E-11
rs2235074	ABCB1	intron	A/G	0.0568	0.1597	3.15	1.71-4.60	3.31E-07
rs20580	LIG1	coding	A/C	0.2199	0.3711	2.09	1.48-2.70	5.05E-07
rs574664	ROS1	intron	T/A	0.1420	0.2630	0.46	0.31-0.62	4.70E-06
rs1042838	PGR	coding	T/G	0.1588	0.2838	2.10	1.42-2.78	6.08E-06
rs732417	STK6	5UTR	C/G	0.1043	0.2042	2.20	1.38-3.03	2.80E-05
rs8177426	GPX3	intron	A/G	0.2290	0.3621	1.91	1.34-2.48	1.90E-05
rs11226	RAD52	3UTR	T/C	0.2288	0.3506	1.82	1.26-2.38	1.30E-04
rs3797896	MSH3	intron	G/C	0.0622	0.0128	5.08	1.97-13.15	2.00E-04

Tabulka č. 17: SNPs vykazující významnou asociaci s MDS.

MAF – minoritní alelická frekvence

OR – poměr šancí

Gene	Name	Gene location
SLC4A2	solute carrier family 4, anion exchanger, member 2	<i>7q36.1</i>
ABCB1	ATP-binding cassette, sub-family B (MDR/TAP), member 1	<i>7q21.12</i>
LIG1	ligase I, DNA, ATP-dependent	<i>19q13.2-q13.3</i>
ROS1	c-ros oncogene 1, receptor tyrosine kinase	<i>6q22</i>
PGR	progesterone receptor	<i>11q22-q23</i>
STK6	aurora kinase A	<i>20q13</i>
GPX3	glutathione peroxidase 3	<i>5q23</i>
RAD52	RAD52 homolog	<i>12p13-p12.2</i>
MSH3	mutS homolog 3	<i>5q11-q12</i>

Tabulka č. 18: Zjištěné geny asociované s MDS.

SNP	Genotype	Controls N (%)	Cases N (%)	OR (95% CI)	p-Values
rs13240966	<i>SLC4A2</i>	237	176		
	GG	74 (31.22)	23(13.07)	1.0 (Ref)	
	CC	64 (27.00)	96 (54.55)	4.83 (2.74-8.49)	< 0.0001
	CG	99(41.77)	57 (32.39)	1.85 (1.05-3.28)	0,03
	CC+CG	163 (68.78)	153 (86.93)	3.02 (1.80-5.07)	< 0.0001
rs2235074	<i>ABCB1</i>	264	191		
	GG	235 (89.02)	130 (68.06)	1.0 (Ref)	
	AA	1 (0.38)	0 (0.00)	NA	
	AG	28 (10.61)	61 (31.94)	3.94 (2.40-6.47)	< 0.0001
	AA+AG	29 (10.98)	61 (31.94)	3.80 (2.33-6.21)	< 0.0001
rs20580	<i>LIG1</i>	266	194		
	CC	169 (63.53)	84 (43.30)	1.0 (Ref)	
	AA	20 (7.52)	34 (17.53)	3.42 (1.86-6.30)	< 0.0001
	AC	77 (28.95)	76 (39.18)	1.99 (1.32-3.00)	< 0.0001
	AA+AC	97 (36.47)	110 (56.70)	2.28 (1.54-3.39)	< 0.0001
rs574664	<i>ROS1</i>	264	192		
	TT	193 (73.11)	95 (49.48)	1.0 (Ref)	
	AA	4 (1.52)	4 (2.08)	2.03 (0.50-8.30)	0,19
	TA	67 (25.38)	93 (48.44)	2.82 (1.89-4.20)	< 0.0001
	AA+TA	71 (26.89)	97 (50.52)	2.78 (1.87-4.11)	< 0.0001
rs732417	<i>STK6</i>	259	191		
	GG	205 (79.15)	113 (59.16)	1.0 (Ref)	

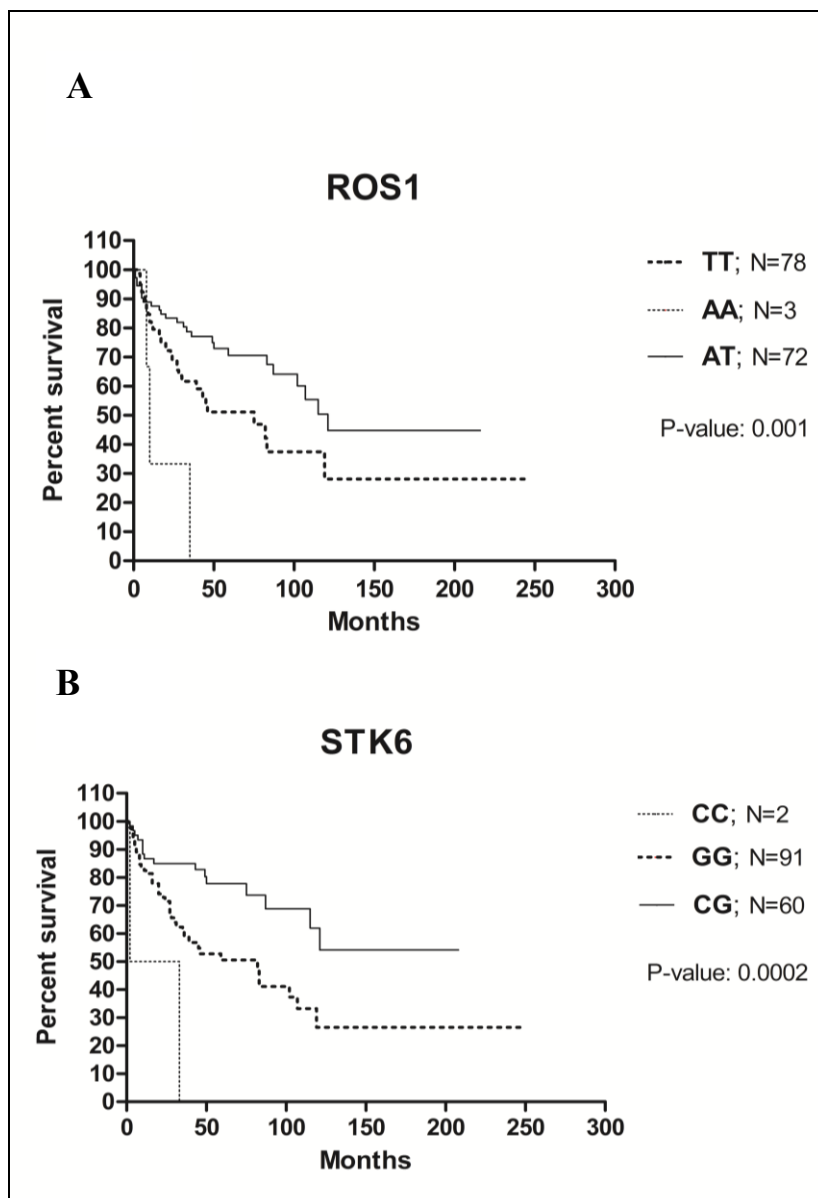
rs1042838	CC	0 (0.00)	0 (0.00)	NA	
	CG	54 (20.85)	78 (40.84)	2.62 (1.73-3.97)	< 0.0001
	CC+CG	54 (20.85)	78 (40.84)	2.62 (1.73-3.97)	< 0.0001
	PGR	255	192		
rs8177426	GG	176(69.02)	86 (44.79)	1.0 (Ref)	
	TT	2 (0.78)	3 (1.56)	3.07 (0.50-18.71)	0,3
	TG	77(30.20)	103 (53.65)	2.74 (1.85-4.05)	< 0.0001
	TT+TG	79 (30.98)	106 (54.69)	2.75 (1.83-4.13)	< 0.0001
rs11226	GPX3	262	174		
	GG	156 (59.54)	82 (47.13)	1.0 (Ref)	
	AA	14 (5.34)	34 (19.54)	4.62 (2.35-9.10)	< 0.0001
	AG	92 (35.11)	58 (33.33)	1.20 (0.79-1.83)	0,4
rs3797896	AA+AG	106 (40.46)	92 (52.87)	1.65 (1.12-2.43)	0,01
	RAD52	236	174		
	CC	145 (61.44)	84 (48.28)	1.0 (Ref)	
	TT	17 (7.20)	32 (18.39)	3.25 (1.70-6.20)	0,0002
rs3797896	TC	74 (31.36)	58 (33.33)	1.35 (0.87-2.09)	0,17
	TT+TC	91 (38.56)	90 (51.72)	1.71(1.15-2.54)	0,01
	MSH3	265	194		
	CC	235 (88.68)	189 (97.42)	1.0 (Ref)	
rs3797896	GG	3 (1.13)	0 (0.00)	NA	
	GC	27 (10.19)	5 (2.58)	0.23 (0.09-0.61)	0,001
	GG+GC	30 (11.32)	5 (2.58)	0.21 (0.08-0.54)	0,0005

Tabulka č. 19: Asociace mezi jednotlivými genotypy a MDS.

OR – poměr šancí

Controls N-kontrolní skupina, počet

Cases N-případy, počet



Obrázek č. 20: Celkové přežití pacientů v závislosti na genotypu v genu *ROS1* a *STK6*.

Validace výsledků

Výsledky SNP genotypování byly validovány u třech vybraných SNPs (genů *LIG1*, *RAD52* a *GPX3*) pomocí SNPsTaqMan Assays (Life Technologies, USA). CD3⁺ a CD14⁺ buňky byly použity pro rozlišení zárodečného nebo somatického stavu. Status daného polymorfismu genů *LIG1*, *RAD52* a *GPX3* mezi CD3⁺ T lymfocyty a CD14⁺ monocyty u 68 pacientů byl shodný.

5.1 Diskuze a závěry k tématu - Mutace v genu *TP53*

V tomto projektu jsme se zabývali přítomností mutací v tumor supresorovém genu *TP53* u pacientů s nízkým rizikem MDS, mutační zátěží v jednotlivých typech buněk a jejich vlivem na klinický průběh onemocnění. Výskyt mutací v genu *TP53* je častý a dobře popsán u solidních nádorů a v posledních letech je také zkoumán u hematologických onemocnění. Jako nástroj pro detekci mutací jsme použili metodu NGS, která díky vysoké citlivosti je schopna zachytit mutace s nízkou frekvencí.

Mutace v genu *TP53* byly popsány u vysoce rizikového MDS a byly asociovány s komplexním karyotypem (Sallman et al., 2016; Sallman et al., 2017; Wong et al., 2015). V tomto projektu jsme se zaměřili na pacienty s nízkým rizikem s dobrou prognózou, nicméně jsou mezi nimi i pacienti, kteří progredují, aniž by bylo možné zjistit, z jakých příčin.

Vyšetřili jsme celkem 154 pacientů s nízkým rizikem MDS. Detekovali jsme 33 mutací u 20 pacientů (13%). Zjistili jsme asociaci mezi mutací *TP53* a del(5q), kdy u 23,6% pacientů nesoucí del(5q) se vyskytovala mutace, ale pouze u 3,8% pacientů bez delecce.

Dvě třetiny mutací byly detekovány již v době diagnózy a jedna třetina vznikla až v průběhu onemocnění. Většina mutací zjištěných u pacientů s nižším rizikem MDS měla nízkou hodnotu VAF (<6%). Tyto mutace lze nalézt pouze za použití citlivé NGS technologie, která je schopna identifikovat mutace s nízkým zastoupením. Některé z těchto identifikovaných mutací by nebyly detekovány klasickým Sangerovým sekvenováním, které má citlivost maximálně 20% VAF.

Negativní účinek malých *TP53* mutovaných subklonů na OS byl popsán u chronické lymfocytární leukémie (Rossi et al., 2014; Landau et al., 2013). Navíc Papaemmanuil a kol. (Papaemmanuil et al., 2013) ukázali, že subklonální události jsou pravděpodobně podobně prognosticky důležité jako klonální. Přesný prognostický dopad malého mutovaného *TP53* klonu u pacientů s nízkým rizikem MDS však není znám. K posouzení dopadu mutační zátěže *TP53* na přežití MDS jsme určili optimální mezní hodnotu VAF pro zjištění rozdílů v přežití pacientů, která byla stanovena na úrovni 6%.

Pacienty bylo tedy možné rozdělit do 3 skupin, a to podle velikosti mutační zátěže (nad a pod 6% VAF) a doby prvního výskytu mutace. První skupina pacientů, u nichž byla mutace detekována již v době diagnózy s vyšší mutační zátěží (>6% VAF) měla median OS 43,5 měsíců oproti 138 měsícům pacientů bez mutace (HR 12.18; $p=0.003$). Stejně tak tato skupina pacientů měla zkrácené přežití bez progresu (PFS; progression-free survival) na 20,2 měsíce oproti 116,6 měsícům u pacientů bez mutace (HR 79.5; $p<0.0001$). Druhá skupina pacientů, u nichž byla mutace detekována v době diagnózy s <6% VAF a třetí skupina, která mutaci získala, až v průběhu nemoci, neměla signifikantně zkrácené OS a PFS oproti pacientům bez mutace. Tato zjištění naznačují, že malé *TP53*-mutované subklony nemají stejný nepříznivý prognostický dopad na OS a PFS, tak jako klony s vysokou mutační zátěží u pacientů s nižším rizikem MDS. To je v souladu se studií Jäderstena a kol., kteří zjistili, že malé *TP53*-mutované subklony mohou být stabilní určitou dobu před progresí onemocnění (Jädersten et al., 2011). Stejně tak, jako zjištění Wonga a kol., že v periferní krvi 44% zdravých jedinců ve věku 50 let je možné detekovat velmi malé subklony s mutací v genu *TP53* (Wong et al., 2015).

Mutace v *TP53* se mohou objevit v různých fázích maligní transformace, mutace jsou přítomny jak u MDS s nižším rizikem, tak u pacientů s vyšším rizikem, stejně jako u AML. Mutace genu *TP53* pravděpodobně přispívají k různým krokům tohoto procesu (Rivlin et al., 2011). *TP53* mutace mohou iniciovat maligní transformaci u MDS s nižším rizikem, indukovat agresivnější růst klonů nebo poskytnout výhody přežití pro mutované buňky, jako je zvýšená proliferace nebo snížená apoptóza v pokročilých stádiích MDS. V naší kohortě pacientů přítomnost mutací *TP53* pravděpodobně představovala jednu z časných událostí maligní transformace. Nicméně naše zjištění naznačují, že pacienti s nízkým rizikem MDS mohou přežívat s malými subklony *TP53* po dobu několika let, na rozdíl od těch s vyššími riziky MDS a leukemií, jak je popsáno v některých studiích (Volkert et al., 2014; Rossi et al., 2014; Landau et al., 2013; Devillier et al., 2015). Předpokládáme, že pacienti s nižším rizikem MDS mají více indolentní formy MDS než pacienti s agresivním, proliferativním MDS a AML.

Zvětšení mutovaného klonu po léčbě LEN u většiny pacientů (deset z jedenácti pacientů) může odrážet selektivní tlak léčby na mutované buňky. Nicméně toto zvýšení mutační zátěže v reakci na léčbu může trvat až několik let. V naší studii jsme nezaznamenali významné rozdíly v OS a PFS mezi skupinami pacientů léčených LEN s mutacemi a bez nich.

Dále jsme multivariantní analýzou zjistili, že *TP53* mutace (HR 3.7), pohlaví (HR 2.6) a počet destiček (HR 0.39) jsou nezávislé prognostické faktory pro PFS a *TP53* mutace (HR 4.4), pohlaví (HR 2.8) a počet destiček (HR 0.5) pro OS. Je zajímavé, že mužští pacienti s nízkým rizikem MDS měli horší prognózu než pacienti ženského pohlaví, tak jak bylo popsáno již dříve (Malcovati et al., 2005; Nösslinger et al., 2010). Stejně jako byla dříve popsána souvislost mezi nízkým počtem krevních destiček a horším přežíváním u pacientů s nižším rizikem MDS (Garcia-Manero et al., 2008; Jonasova et al., 2012).

Dále byla zjištěna korelace ve velikosti VAF mezi buňkami izolovanými z PK a KD, což naznačuje, že PK může sloužit jako spolehlivý materiál pro detekci genových mutací *TP53*, a že není nutné zatěžovat pacienty s aspirací KD. Dokonce i mutace s nízkou alelickou frekvencí (přibližně 1% VAF) byly detekovatelné ve vzorcích PK i KD. V naší studii jsme nezaznamenali žádný případ, kdyby byla mutace zjištěna pouze v KD, ale nebyla detekována v PK. Je možné, že při časném zachytu lze mutaci detekovat nejprve v KD a až později v PK, ale takový případ jsme nezaznamenali.

Závěrem lze říci, že naše studie poskytuje komplexní analýzu *TP53* mutací v různých typech buněk a sériových vzorcích pacientů výhradně s nižším rizikem MDS. Výsledky naznačují, že vyšetřování mutací v genu *TP53* u pacientů s nižším rizikem MDS s del(5q) by mělo být prováděno rutinně pro predikci rizik a umožnění včasné terapeutické intervence. Mutační analýza by měla být prováděna v době stanovení diagnózy, v průběhu choroby, a před zahájením léčby lenalidomidem. Mutace lze stanovovat na buňkách PK, protože výsledky odpovídají výsledkům z buněk KD. Naše data poskytují důkaz, že mutační status genu *TP53* je důležitým prediktorem PFS a OS, stejně jako počet krevních destiček a pohlaví, u pacientů s nižším rizikem MDS. Zvláště pak, velikost mutovaného klonu a fáze nemoci, kdy se mutace prvně objeví, představují významné faktory, určující průběh nemoci.

Stanovené Cíle Ia), Ib) i Ic) byly splněny. Byla zjištěna incidence mutace v genu *TP53* u pacientů s nízkým rizikem MDS, vliv mutace na klinický průběh nemoci i určena mutační zátěž v jednotlivých typech buněk.

5.2 Diskuze a závěry k tématu - Predikce léčebné odpovědi na hypometylační činidla

Identifikace spolehlivých prediktivních biomarkerů pro epigenetickou léčbu by umožnila výběr individuální terapie, a proto je velmi žádoucí. V souladu s tím jsme provedli expresní profilování v CD34+ buňkách KD pacientů s MDS, rozdělených podle odpovědi na léčbu, a detekovali jsme geny, které by mohly predikovat výsledek léčby.

Funkční anotací rozdílně exprimovaných genů mezi pacienty s a bez odpovědi na léčbu jsme identifikovali zvýšenou hladinu mRNA několika ribozomálních genů. Pacienti s progresí měli hladinu ribozomálních genů nejvyšší. Navíc hladina exprese genu *RPL28* korelovala s délkou přežití. Dále byly zjištěny deregulované MAPK a Wnt signální dráhy, které se podílí na regulaci buněčné proliferace. Deregulované MAPK geny (*MAPK12*, *MAP3K11*, *MAP2K2* a *ACVR1B*) ovlivňují všechny tři cesty MAP kináz prostřednictvím genů *ERK*, *JNK* a *MAPK*. Změna DNA methylace komponent MAPK dráhy byla dříve popsána u pacientů s CMML léčených decitabinem, hypometylačním činidlem (Meldi et al., 2015). Jeden z účinků aktivace MAPK zahrnuje změny v translaci mRNA. Dále jsme zjistili změny v kanonické signální dráze Wnt, která se podílí na regulaci proliferace buněk prostřednictvím cílových genů, které pomáhají modulovat rychlost nebo frekvenci proliferace buněk.

Podle studie Sridhara a kol., up-regulace ribozomálních genů je spojena s transformací do AML (Sridhar et al., 2009) a narušení tvorby zralých ribozomů, které kontrolují biosyntézu bílkovin, je spojeno s maligním vývojem (Ruggero et al., 2003). Buňky se zvýšenou proliferací mají vyšší poptávku na syntézu bílkovin, a tyto nároky jsou splněny právě prostřednictvím změn v rychlosti biogeneze ribozomu (Donati et al., 2012). V nedávně době byla v oblasti hematologie diskutována tzv. „Dameshekova hádanka“, která se zabývá paradoxem přechodu od hypo- k hyper-proliferaci při ribozomopatiích. Ribozomopatie jsou onemocnění, u kterých byly nalezeny mutace v proteinech, které se přímo nebo nepřímo podílejí na sestavování ribozomů (De Keersmaecker et al, 2015). Mezi ribozomopatie můžeme zařadit i MDS s izolovanou del(5q) (Barlow et al., 2010).

MDS s vyšším rizikem spolu s AML představují heterogenní skupinu maligních onemocnění charakterizovaných nekontrolovaným růstem klonálních leukemických krvetvorných buněk a je pro ně typické zvýšení proliferčních faktorů. Zjištěná zvýšená exprese ribozomálních genů u pacientů, kteří na léčbu azacitidinem neodpověděli, odráží pravděpodobně vysokou míru proliferace spojenou s progresí a agresivitou nemoci.

Domníváme se, že u pacientů s rozvinutou progresí, která odpovídá zvýšené proliferaci a tím zvýšeným nárokům na biogenezi ribozomů, nelze léčbou azacitidinem již tento proces zvrátit.

Dále byla také zjištěná zvýšená úroveň exprese dvou onkogenů (*EVI2B* a *HOPX*) u pacientů bez odpovědi na léčbu. Gen *EVI2B* je lokalizován ve velkém intronu tumor supresorového genu *NF1* (Largaespada et al., 1995) a jeho vyšší hladina spolu s *EVI2A* byla detekována v buněčné linii myeloidní leukémie (Rücker et al., 2006). Úroveň exprese genu *HOPX* byla začleněna do prognostických modelů AML, kdy jeho zvýšená exprese je nezávislým negativním prognostickým faktorem (Lin et al., 2013).

U pacientů, kteří na léčbu reagovali, došlo po léčbě AZA k signifikantní změně exprese několika genů, které ovlivňují proliferaci (*MYCN*, *RAC3*, *PTK2*, *MLF2*). Gen *MYCN* patří do rodiny proto-onkogenů *MYC*, která kóduje transkripční faktory řídící proliferaci buněk, diferenciaci a apoptózu, a její nadměrná exprese může vést k tumorogenezi (Delgado et al., 2010). Členové rodiny *MYC* byli popsáni jako klíčoví regulátoři biogeneze ribozomů a kontroly translace (Boon et al., 2001). Gen *RAC3* hraje důležitou úlohu v mnoha biologických procesech a je spojován s neopláziemi. Jeho zvýšená exprese byla zjištěna v buněčné linii lidské chronické myeloidní leukémie K562 (Colo et al., 2007). Gen *PTK2* kóduje tyrosinkinázu podílející se na proliferaci, adhezi a migraci buněk a jeho exprese pozitivně koreluje s počtem bílých krvinek při diagnóze a mediánem přežití u AML (Recher et al., 2004). Navíc myeloidní leukemický faktor 2 (*MLF2*) je spojován s myeloidní leukémií.

AZA je ribonukleosid, to znamená, že do RNA se začleňuje v 80-90% a do DNA pouze v 10-20%. Inkorporace AZA do RNA vede k rozložení polyribosomů, defektům transferové RNA a inhibici produkce proteinů. Inkorporace AZA do DNA inhibuje metylaci DNA. Studie Gagnon-Kugler a kol. naznačila, že účinky inhibitorů metylace DNA obecně, včetně AZA, mohou být spíše způsobeny cytotoxickými účinky zprostředkovanými narušením biogeneze ribozomů, než reaktivací nádorových supresorových genů (Gagnon-Kugler et al., 2009; Moss T et al., 2011). Přehledová práce Ruggera, týkající se ribozomů a nádorů, ukázala těsný vztah mezi těmito dvěma procesy (Ruggero et al., 2003). Buněčný růst a proliferace jsou spojeny se změnami rychlosti produkce ribozomů. Existuje důležitý vztah mezi buněčným cyklem a produkcí ribozomů. Tato rovnováha se udržuje v buňce prostřednictvím klíčových kontrolních bodů, které zajišťují, že translace proteinů nastává na příslušných úrovních a v určitých časech v

buněčném cyklu. V nádorových buňkách může být tato rovnováha narušena, což vede k deregulaci syntézy rRNA.

Naše studie ukázala, že nereagující pacienti na AZA léčbu vykazovali vysokou expresi ribozomálních genů před léčbou, která pravděpodobně odrážela intenzivní proteosyntézu v proliferativních buňkách. Naše údaje podporují hypotézu, že možné selhání léčby je výsledkem vysoké míry proliferace a naznačují, že pokročilý stav onemocnění nelze zvrátit demetylační léčbou. Další studie jsou potřebné k potvrzení těchto výsledků v nezávislé kohortě pacientů.

Specifické cíle IIa) i IIb) byly splněny. Byla nalezena skupina genů, která by mohla predikovat reakci na léčbu, a byly popsány geny, jejichž exprese byla léčbou signifikantně ovlivněna.

5.3 Diskuze a závěry k tématu - Identifikace bodových polymorfismů asociovaných s MDS

Asociační studie byla provedena mezi vybranými SNPs a skupinou MDS pacientů. Nevýznamnější asociaci vykazoval rs13240966 SNP ($p = 7.00E-11$), který se nachází v genu *SLC4A2*. Tento gen kóduje membránový transportní protein, který se podílí na regulaci intracelulárního pH. Zjistili jsme souvislost mezi homozygotním C/C genotypem a pacienty MDS (OR 4,86; 95% CI 2,74-8,62). Asociace tohoto SNP s rakovinou močového měchýře byla již dříve popsána (Andrew et al., 2009). Také jsme našli významnou asociaci mezi MDS a polymorfismem rs2235074 v genu, který kóduje další transmembránový protein patřící do transportérové rodiny ABC. Konkrétně gen *ABCB1*, který je zodpovědný za sníženou akumulaci léků v multilékově rezistentních buňkách a často je zodpovědný za odolnost vůči protinádorovým lékům. V naší kohortě pacientů významně převládal heterozygotní genotyp A/G (OR 3.79; 95% CI 2.30-6.24). Některé polymorfismy nacházející se v tomto genu byly již popsány u akutní lymfoblastické leukemie a byly spojeny se špatnou prognózou (Rao et al., 2010).

Gen kódující *LIG1* byl reprezentován polymorfismem rs20580. Zjistili jsme vztah mezi homozygotním A/A genotypem tohoto genu a MDS ($p = 1.65E-06$; OR 3.28; 95% CI 1.77-6.06). Protein *LIG1* se účastní oprav DNA vystřížením nukleotidů (nucleotide excision repair, NER). Tento polymorfismus byl dáván do souvislosti s rakovinou plic (Lee et al., 2008). Nalezli jsme další dva polymorfismy v genech spojených s opravami DNA, které souvisely s MDS. První z těchto polymorfismů byl rs11226 SNP ($p = 1,70E-04$) genu

RAD52, který se podílí na opravě dvouvláknové DNA a homologní rekombinaci. Druhý polymorfismus rs3797896 ($p = 2,16E-04$) je lokalizován v genu *MSH3*, který je součástí oprav chybného párování bází (mismatch repair, MMR). Byly nalezeny další varianty genů zapojených do oprav DNA asociované s MDS ($p < 0,01$), včetně rs2238335 v genu *BLM*, rs2308327 v *MGMT*, rs4149963 v *EXO1* a rs7607076 v genu *MSH2*. Několik studií ukázalo, že polymorfismy v genech reagující na DNA poškození (DNA damage-response genes, DDR) a v genech pro opravy DNA ovlivňují schopnost opravit poškozenou DNA (Shin et al., 2008; Beesley et al., 2007). Domníváme se, že poškození DNA způsobené neúčinnou detoxikací nebo defekty při opravě DNA mohou vést k chromozomální nestabilitě, která může být spojena s tvorbou nádorů či progresí. Tak se mohou genetické varianty podílet na vzniku MDS.

Další SNP detekovaný v této studii, s nímž MDS asociuje je rs732417 ($p = 7,76E-05$), který je umístěn v genu *STK6/AURKA*. *AURKA*, serin/threonin kináza, reguluje kontrolní body buněčného cyklu a udržuje genomickou integritu. Zjistili jsme spojení mezi heterozygotním C/G genotypem a rizikem vzniku MDS (OR 2,43, 95% CI 1,60 až 3,70). Určité alelické varianty tohoto genu jsou spojeny se změnami v expresi a zvýšeným rizikem vzniku rakoviny (Ewart-Toland et al., 2005; Matarasso et al., 2007). Stejně tak, jedinci s určitými polymorfismy v genu *AURKA* jsou významně náchylnější k rakovině močového měchýře (Andrew et al., 2009).

Výsledky získané z „čipové“ platformy byly validovány pomocí jiné genotypovací metody – SNPsTaqMan Assays. Korelační koeficient 0,99 mezi oběma platformami ukázal na dobrou korelaci dat. U vybraných polymorfismů (genů *LIG1*, *RAD52*, *GPX3*) byl navíc stanoven genotyp v CD3+ T lymfocytech a zároveň CD14+ monocytech pro potvrzení zárodečného původu polymorfismů.

V této studii jsme identifikovali několik genetických variant, které se mohou podílet na patogenezi MDS. Do vyšetřovaného souboru byli zařazeni striktně jen pacienti s primární formou MDS, protože zařazení pacientů se sekundární formou MDS by mohlo dezinterpretovat výsledky. Tento typ MDS vzniká následně po podané léčbě jiného typu rakoviny a mohli bychom tak detekovat SNPs související s odlišnou formou nádoru.

6. SOUHRN

I když je MDS desítky let v zájmu vědců, a je intenzivně zkoumán nově vyvinutými metodami, přesná patogenese tohoto heterogenního onemocnění nebyla stále objasněna. V současné době jsou usilovně zkoumány genetické i epigenetické změny hematopoetických kmenových buněk, které dokazují klonální vícestupňový proces onemocnění. U části pacientů, kteří transformují od časných/premaligních forem po stavy pokročilé, které již plně odpovídají nádorovému onemocnění, můžeme pozorovat vlastně *in vivo* model vzniku leukemie.

Stejně jako u ostatních nádorových onemocnění bývá MDS diagnostikováno v pokročilejším věku a souvisí s procesem stárnutí, kdy dochází k akumulaci genetických změn a klesá schopnost oprav DNA. Předpokládáme, že na základě určitých genetických predispozic a schopností reagovat na endogenní a exogenní podněty, se u části starší populace rozvine MDS. U pacientů se sekundárním MDS, i když mají podobné klinické projevy jako pacienti s primárním MDS, se jedná o jinou iniciaci onemocnění, kde jejich genom je poškozen léčbou předchozího nádorového onemocnění.

Cílem této práce bylo zkoumat procesy podílející se na vzniku a rozvoji MDS. Konkrétně byla řešena tři témata s následujícími závěry:

I. U MDS pacientů s nízkým rizikem a del(5q) je mutace v genu *TP53* častější (23,6%) než u pacientů bez delece (3,8%). Detekovaná mutace slouží jako nejsilnější nepříznivý prognostický marker pro OS i PFS. Malé *TP53*-mutované subklony nemají stejný nepříznivý prognostický dopad jako klony s velkou mutační zátěží. Mutace byly zachyceny v PK i KD se stejnou frekvencí. Na základě zjištěných skutečností se domníváme, že by mělo být určování mutací v genu *TP53* u pacientů s nízkým rizikem MDS prováděno rutinně v době stanovení diagnózy, v průběhu choroby, a před zahájením léčby.

II. Identifikovali jsme zvýšenou expresi několika ribozomálních genů u pacientů bez odpovědi před zahájenou léčbou AZA, což pravděpodobně odráželo intenzivní proteosyntézu v buňkách se zvýšenou proliferací. Předpokládáme, že selhání léčby je výsledkem vysoké míry proliferace a pokročilého stavu onemocnění, který nelze demetylační léčbou zvrátit. Dále jsme identifikovali několik genů, jejichž exprese se po podání AZA změnila výhradně u reagujících pacientů, a mohly by sloužit jako markery pro sledování úspěšné terapie.

III. Nalezli jsme devět bodových polymorfismů, které byly asociované s MDS fenotypem. Z toho tři SNPs se nacházejí v DNA reparačních genech (*LIG1*, *RAD52*, *MSH3*) a jeden SNP v genu, který chrání buňky před oxidačním poškozením (*GPX3*). Tyto geny by mohly být zapojeny do vzniku MDS. Dále byly identifikovány dva SNPs (*ROS1*, *STK6*), jejichž genotyp byl asociován s celkovým přežitím pacientů.

LITERATURA

- Ademà V, Hernández JM, Abáigar M, et al. Application of FISH 7q in MDS patients without monosomy 7 or 7q deletion by conventional G-banding cytogenetics: does -7/7q- detection by FISH have prognostic value? *Leuk Res*. 2013 Apr;37(4):416-21.
- Andrew AS, Gui J, Sanderson AC, et al. Bladder cancer SNP panel predicts susceptibility and survival. *Hum Genet* 2009, 125:527–539.
- Arber DA, Orazi A, Hasserjian R, et al. The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. *Blood*, 2016; 127(20), 2391–2406.
- Aubrey BJ, Strasser A, Kelly GL. Tumor-Suppressor Functions of the TP53 Pathway. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2016 May 2;6(5).
- Bannon SA, DiNardo CD. Hereditary Predispositions to Myelodysplastic Syndrome. *Int J Mol Sci*. 2016 May 30;17(6).
- Barlow JL, Drynan LF, Trim NL, et al. New insights into 5q- syndrome as a ribosomopathy. *Cell Cycle*. 2010;9:4286-93.
- Barrett J, Sauntharajah Y, and Molldrem J. Myelodysplastic syndrome and aplastic anemia: distinct entities or diseases linked by a common pathophysiology? *Seminars in Hematology*, 2000; 37(1), 15–29.
- Barzi A. and Sekeres MA. Myelodysplastic syndromes: a practical approach to diagnosis and treatment. *Cleve Clin J Med*. 2010; 77: 37–44.
- Beesley J, Jordan SJ, Spurdle AB, et al. Association between single-nucleotide polymorphisms in hormone metabolism and DNA repair genes and epithelial ovarian cancer: results from two Australian studies and an additional validation set. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2007, 16:2557–2565.
- Bejar R, Lord A, Stevenson K, et al. TET2 mutations predict response to hypomethylating agents in myelodysplastic syndrome patients. *Blood*. 2014; 124:2705–12.
- Bejar R, Stevenson K, Abdel-Wahab O, et al. Clinical effect of point mutations in myelodysplastic syndromes. *N Engl J Med*. 2011 Jun 30;364(26):2496-506.
- Bejar R. Splicing Factor Mutations in Cancer. *Adv Exp Med Biol*. 2016;907:215-28
- Bejar R. Clinical and genetic predictors of prognosis in myelodysplastic syndromes. *Haematologica*. 2014 Jun;99(6):956-64.
- Bejar R, Steensma DP. Recent developments in myelodysplastic syndromes. *Blood*. 2014 Oct 30;124(18):2793-803.
- Bejar R, Stevenson KE, Caughey BA, et al. Validation of a prognostic model and the impact of mutations in patients with lower-risk myelodysplastic syndromes. *J Clin Oncol*. 2012 Sep 20;30(27):3376-82.
- Belickova M, Vesela J, Jonasova A, et al. TP53 mutation variant allele frequency is a potential predictor for clinical outcome of patients with lower-risk myelodysplastic syndromes. *Oncotarget*. 2016 Jun 14;7(24):36266-36279.

- Bennett JM, Catovsky D, Daniel MT, et al. Proposals for the classification of the myelodysplastic syndromes. *British Journal of Haematology*. 1982;51 (2): 189-99.
- Bennett JM, Catovsky D, Daniel MT, et al. Proposals for the classification of the acute leukaemias. French-American-British (FAB) co-operative group. *Br J Haematol*. 1976;33(4):451-8.
- Bieging KT, Mello SS, Attardi LD. Unravelling mechanisms of p53-mediated tumour suppression. *Nat Rev Cancer*. 2014 May;14(5):359-70.
- Boon K, Caron HN, van Asperen R, et al. N-myc enhances the expression of a large set of genes functioning in ribosome biogenesis and protein synthesis. *EMBO J*. 2001; 20, 383–93.
- Boultonwood J, Pellagatti A, McKenzie AN, et al. Advances in the 5q- syndrome. *Blood*. 2010 Dec 23;116(26):5803-11.
- Boultonwood J, Pellagatti A, Wainscoat JS. 5q- syndrome. *Curr Pharm Des*. 2012;18(22):3180-3.
- Bowen DT. Occupational and environmental etiology of MDS. *Best Pract Res Clin Haematol*. 2013;26(4):319-26.
- Brezinova J, Zemanova Z, Bystricka D, et al. Deletion of the long arm but not the 5q31 region of chromosome 5 in myeloid malignancies. *Leuk Res*. 2012;36: 43-45.
- Cazzola M, Della Porta MG, Malcovati L. The genetic basis of myelodysplasia and its clinical relevance. *Blood*. 2013 Dec 12; 122(25): 4021–4034.
- Cluzeau T, Robert G, Mounier N, et al. BCL2L10 is a predictive factor for resistance to azacitidine in MDS and AML patients. *Oncotarget*. 2012 Apr; 3:490-501.
- Colo GP, Rosato RR, Grant S, Costas MA. RAC3 down-regulation sensitizes human chronic myeloid leukemia cells to TRAIL-induced apoptosis. *FEBS Lett*. 2007;581:5075-81.
- Cordoba I, González-Porras JR, Nomdedeu B, et al. Spanish Myelodysplastic Syndrome Registry. Better prognosis for patients with del(7q) than for patients with monosomy 7 in myelodysplastic syndrome. *Cancer*. 2012 Jan 1;118(1):127-33.
- Danjou F, Fozza C, Zoledziwska M, et al. A genome-wide association study by ImmunoChip reveals potential modifiers in myelodysplastic syndromes. *Exp Hematol*. 2016 Nov;44(11):1034-1038.
- Davies S, Dai D, Feldman I, et al. Identification of a novel mechanism of NF-kappaB inactivation by progesterone through progesterone receptors in Hec50co poorly differentiated endometrial cancer cells: induction of A20 and ABIN-2. *Gynecol Oncol* 2004, 94:463–470.
- De Keersmaecker K, Sulima SO, Dinman JD. Ribosomopathies and the paradox of cellular hypo- to hyperproliferation. *Blood*. 2015;125:1377-82.
- del Rey M, O'Hagan K, Dellett M, et al. Genome-wide profiling of methylation identifies novel targets with aberrant hypermethylation and reduced expression in low-risk myelodysplastic syndromes. *Leukemia*. 2013 Mar, 27(3): 610-618.

Delgado MD, León J. Myc roles in hematopoiesis and leukemia. *Genes Cancer*. 2010;1:605-16.

Della Porta MG, Tuechler H, Malcovati L et al. Validation of WHO classification-based Prognostic Scoring System (WPSS) for myelodysplastic syndromes and comparison with the revised International Prognostic Scoring System (IPSS-R). A study of the International Working Group for Prognosis in Myelodysplasia (IWG-PM). *Leukemia*. 2015 Jul;29(7):1502-13.

Devillier R, Mansat-De Mas V, Gelsi-Boyer V, et al. Role of ASXL1 and TP53 mutations in the molecular classification and prognosis of acute myeloid leukemias with myelodysplasia-related changes. *Oncotarget*. 2015; 6: 8388-8396.

Diesch J, Zwick A, Garz AK, et al. A clinical-molecular update on azanucleoside-based therapy for the treatment of hematologic cancers. *Clin Epigenetics*. 2016 Jun 21;8:71.

Donati G, Montanaro L, Derenzini M. Ribosome biogenesis and control of cell proliferation: p53 is not alone. *Cancer Res*. 2012;72(7):1602-7.

Ebert BL. Molecular dissection of the 5q deletion in myelodysplastic syndrome. *Semin Oncol*. 2011 Oct;38(5):621-6.

Ewart-Toland A, Dai Q, Gao YT, et al. Aurora-A/STK15 T + 91A is a general low penetrance cancersusceptibility gene: a meta-analysis of multiple cancer types. *Carcinogenesis* 2005, 26:1368–1373.

Fabiani E, D'Alò F, Scardocci A, et al. Polymorphisms of detoxification and DNA repair enzymes in myelodysplastic syndromes. *Leuk Res* 2009, 33:1068–1071.

Fenaux P, Giagounidis A, Selleslag D, et al. A randomized phase 3 study of lenalidomide versus placebo in RBC transfusion-dependent patients with Low-/Intermediate-1-risk myelodysplastic syndromes with del5q. *Blood*. 2011 Oct 6;118(14):3765-76.

Fenaux P, Mufti GJ, Hellstrom-Lindberg E, et al. International Vidaza High-Risk MDS Survival Study Group. Efficacy of azacitidine compared with that of conventional care regimens in the treatment of higher-risk myelodysplastic syndromes: a randomised, open-label, phase III study. *Lancet Oncol*. 2009, 10(3): 223–232.

Fidler C, Watkins F, Bowen DT, et al., NRAS J. FLT3 and TP53 mutations in patients with myelodysplastic syndrome and a del(5q). *Haematologica*. 2004;89(7):865-866.

Figuerola ME, Skrabanek L, Li Y, et al. MDS and secondary AML display unique patterns and abundance of aberrant DNA methylation. *Blood* 2009, 114(16): 3448–3458.

Follo MY, Finelli C, Mongiorgi S, et al. Reduction of phosphoinositide-phospholipase C beta1 methylation predicts the responsiveness to azacitidine in high-risk MDS. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2009; 106:16811-6.

Foran JM, Shammo JM. Clinical presentation, diagnosis, and prognosis of myelodysplastic syndromes. *Am J Med*. 2012; Jul;125(7 Suppl):S6-13.

Fozza C, Crobu V, Isoni MA, et al. The immune landscape of myelodysplastic syndromes. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2016 Nov;107:90-99.

- Gagnon-Kugler T, Langlois F, Stefanovsky V, et al. Loss of human ribosomal gene CpG methylation enhances cryptic RNA polymerase II transcription and disrupts ribosomal RNA processing. *Mol Cell*. 2009 Aug 28;35(4):414-25.
- Garcia-Manero G, Shan J, Faderl S, et al. A prognostic score for patients with lower risk myelodysplastic syndrome. *Leukemia*. 2008; 22: 538-543.
- Gill H, Leung AY, Kwong YL. Molecular and Cellular Mechanisms of Myelodysplastic Syndrome: Implications on Targeted Therapy. *Int J Mol Sci*. 2016 Mar 24;17(4):440.
- Glover AB, Leyland-Jones B. Biochemistry of azacitidine: a review. *Cancer Treat Rep*. 1987; 71:959-64.
- Gondek LP, Tiu R, O'Keefe CL, et al. Chromosomal lesions and uniparental disomy detected by SNP arrays in MDS, MDS/MPD, and MDS-derived AML. *Blood*. 2008 Feb 1;111(3):1534-42.
- Greenberg P L, Cox C, LeBeau MM, et al. International scoring system for evaluating prognosis in myelodysplastic syndromes. *Blood*, 1997; 89(6), 2079–88.
- Greenberg PL, Tuechler H, Schanz J, et al. Revised international prognostic scoring system for myelodysplastic syndromes. *Blood*, 2012; 120(12), 2454–2465.
- Grosjean-Raillard J, Adès L, Boehrer S, et al. Flt3 receptor inhibition reduces constitutive NFkappaB activation in high-risk myelodysplastic syndrome and acute myeloid leukemia. *Apoptosis* 2008, 13:1148–1161.
- Haase D, Germing U, Schanz J, et al. New insights into the prognostic impact of the karyotype in MDS and correlation with subtypes: evidence from a core dataset of 2124 patients. *Blood*. 2007; 110:4385-4395.
- Harada H and Harada Y. Recent advances in myelodysplastic syndromes: Molecular pathogenesis and its implications for targeted therapies. *Cancer Sci*. 2015; 106(4): 329–336.
- Harris NL, Jaffe ES, Diebold J, et al. World Health Organization classification of neoplastic diseases of the hematopoietic and lymphoid tissues: report of the Clinical Advisory Committee meeting-Airlie House, Virginia, November 1997. *J Clin Oncol*. 1999, 17: 3835–3849.
- Hasle H, Niemeyer CM, Chessells JM, et al. A pediatric approach to the WHO classification of myelodysplastic and myeloproliferative diseases. *Leukemia*. 2003; 17, 277–282.
- Hellstrom-Lindberg, E. Myelodysplastic Syndromes. Remedica Publisher, London; 2008.
- Hopfer O, Komor M, Koehler IS et al. Aberrant promotor methylation in MDS hematopoietic cells during in vitro lineage specific differentiation is differently associated with DNMT isoforms. *Leuk Res*. 2009, 33(3): 434–442.
- Hussain FT, Nguyen EP, Raza S, et al. Sole abnormalities of chromosome 7 in myeloid malignancies: spectrum, histopathologic correlates, and prognostic implications. *A. Am J Hematol*. 2012 Jul;87(7):684-6.
- Cheson BD, Bennett JM, Kopecky KJ, et al. Revised recommendations of the International Working Group for Diagnosis, Standardization of Response Criteria, Treatment Outcomes,

and Reporting Standards for Therapeutic Trials in Acute Myeloid Leukemia. *J Clin Oncol*. 2003;21:4642–4649.

Cheson BD, Greenberg PL, Bennett JM, et al. Clinical application and proposal for modification of the International Working Group (IWG) response criteria in myelodysplasia. *Blood*. 2006;108:419–425.

Churpek JE, Pyrtel K, Kanchi KL, et al. Genomic analysis of germ line and somatic variants in familial myelodysplasia/acute myeloid leukemia. *Blood*. 2015 Nov 26;126(22):2484-90

Itzykson R, Fenaux P. Epigenetics of myelodysplastic syndromes. *Leukemia* 2014 Mar, 28(3): 497-506.

Itzykson R, Thépot S, Quesnel B, et al. Groupe Francophone des Myelodysplasies(GFM). Prognostic factors for response and overall survival in 282 patients with higher-risk myelodysplastic syndromes treated with azacitidine. *Blood* 2011 Jan 13, 117(2): 403-411.

Jädersten M, Saft L, Smith A, et al. TP53 mutations in low-risk myelodysplastic syndromes with del(5q) predict disease progression. *J Clin Oncol*. 2011;29(15):1971-1979.

Jiang Y, Dunbar A, Maciejewski JP, et al. Aberrant DNA methylation is a dominant mechanism in MDS progression to AML. *Blood* 2009 Feb 5, 113(6): 1315-1325.

Jonasova A, Cermak J, Vondrakova J, et al. Thrombocytopenia at diagnosis as an important negative prognostic marker in isolated 5q- MDS (IPSS low and intermediate-1). *Leuk Res*. 2012; 36: e222-224.

Katoh M. Mutation spectra of histone methyltransferases with canonical SET domains and EZH2-targeted therapy. *Epigenomics*. 2016 Feb;8(2):285-305.

Kern W, Haferlach C, Schnittger S, et al. Clinical utility of multiparameter flow cytometry in the diagnosis of 1013 patients with suspected myelodysplastic syndrome: correlation to cytomorphology, cytogenetics, and clinical data. *Cancer*. 2010 Oct 1;116(19):4549-63.

Kulasekararaj AG, Mohamedali AM, Mufti GJ. Recent advances in understanding the molecular pathogenesis of myelodysplastic syndromes. *Br J Haematol*. 2013; Sep, 162(5): 587-605.

Kulasekararaj AG, Smith AE, Mian SA, et al. TP53 mutations in myelodysplastic syndrome are strongly correlated with aberrations of chromosome 5, and correlate with adverse prognosis. *Br J Haematol*. 2013;160(5):660-672.

Kwok B, Hall JM, Witte JS, et al. MDS-associated somatic mutations and clonal hematopoiesis are common in idiopathic cytopenias of undetermined significance. *Blood*. 2015 Nov 19;126(21):2355-61.

Landau DA, Carter SL, Stojanov P, et al. Evolution and impact of subclonal mutations in chronic lymphocytic leukemia. *Cell*. 2013; 152: 714-726.

Largaespada DA, Shaughnessy Jr JD, Jenkins NA, et al. Retroviral integration at the Evi-2 locus in BXH-2 myeloid leukemia cell lines disrupts Nf1 expression without changes in steady-state Ras-GTP levels. *J Virol* 1995; 69: 5095–102.

Lee YC, Morgenstern H, Greenland S, et al. A case–control study of the association of the polymorphisms and haplotypes of DNA ligase I with lung and upper-aerodigestive-tract cancers. *Int J Cancer* 2008, 122:1630–1638.

- Lichtman MA. Clonal hematopoiesis: a "CHIP" off the old block. *Blood*. 2015 Jul 2;126(1):1-2.
- Lin CC, Chiu YC, Hou HS, et al. Clinical and Prognostic Relevance of Expression of Homeodomain-Only Protein Homeobox (HOPX) in Acute Myeloid Leukemia. 2013; *Blood*: 122.Abstract .
- Link DC, Walter MJ.' CHIP'ping away at clonal hematopoiesis. *Leukemia*. 2016 Aug;30(8):1633-5.
- Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) method. *Methods*. 2001;25: 402-408.
- Ma W, Kantarjian H, Zhang K, et al. Significant association between polymorphism of the erythropoietin gene promoter and myelodysplastic syndrome. *BMC Med Genet* 2010, 11:163.
- Makishima H, Rataul M, Gondek LP, et al. FISH and SNP-A karyotyping in myelodysplastic syndromes: improving cytogenetic detection of del(5q), monosomy 7, del(7q), trisomy 8 and del(20q). *Leuk Res*. 2010 Apr;34(4):447-53.
- Malcovati L, Ambaglio I, Elena C. The genomic landscape of myeloid neoplasms with myelodysplasia and its clinical implications. *Curr Opin Oncol*. 2015 Nov;27(6):551-9.
- Malcovati L, Cazzola M. The shadowlands of MDS: idiopathic cytopenias of undetermined significance (ICUS) and clonal hematopoiesis of indeterminate potential (CHIP). *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2015;2015:299-307.
- Malcovati L, Hellström-Lindberg E, Bowen D, et al. Diagnosis and treatment of primary myelodysplastic syndromes in adults : recommendations from the European LeukemiaNet. *Blood*, 2013; 122(17), 2943–2964.
- Malcovati L, Karimi M, Papaemmanuil E, et al. SF3B1 mutation identifies a distinct subset of myelodysplastic syndrome with ring sideroblasts. *Blood*. 2015 Jul 9;126(2):233-41.
- Malcovati L, Porta MG, Pascutto C. Prognostic factors and life expectancy in Myelodysplastic syndromes classified according to WHO criteria: A basis for clinical decision making. *J Clin Oncol*. 2005; 23: 7594-7603.
- Mallo M, Cervera J, Schanz J, et al. Impact of adjunct cytogenetic abnormalities for prognostic stratification in patients with myelodysplastic syndrome and deletion 5q. *Leukemia*. 2011 Jan;25(1):110-20
- Matarasso N, Bar-Shira A, Rozovski U, et al. Functional analysis of the Aurora Kinase A Ile31 allelic variant in human prostate. *Neoplasia* 2007, 9:707–715.
- Meldi K, Qin T, Buchi F, et al. Specific molecular signatures predict decitabine response in chronic myelomonocytic leukemia. *J Clin Invest*. 2015;125:1857-72.
- Merkerova MD, Bystricka D, Belickova M, et al. J.From cryptic chromosomal lesions to pathologically relevant genes: integration of SNP-array with gene expression profiling in myelodysplastic syndrome with normal karyotype. *Genes Chromosomes Cancer*. 2012 May;51(5):419-28.
- Mian SA, Rouault-Pierre K, Smith AE, et al. SF3B1 mutant MDS-initiating cells may arise from the haematopoietic stem cell compartment. *Nat Commun*. 2015 Dec 8;6:10004.

Miltiades P, Lamprianidou E, Vassilakopoulos TP, et al. Expression of CD25 antigen on CD34+ cells is an independent predictor of outcome in late-stage MDS patients treated with azacitidine. *Blood Cancer Journal*. 2014; 4:e187.

Moss T. DNA methyltransferase inhibition may limit cancer cell growth by disrupting ribosome biogenesis. *Epigenetics*. 2011 Feb;6(2):128-33.

Murphy DM, Bejar R, Stevenson K, et al. NRAS mutations with low allele burden have independent prognostic significance for patients with lower risk myelodysplastic syndromes. *Leukemia*. 2013 Oct;27(10):2077-81.

Neuwirtová R, Fuchs O, Jonášová A. Novinky v patogenezi dvou podtypů myelodysplastického syndromu: 5q minus syndromu a sideroblastické anémie, částečně platné i u jiných onkohematologických onemocnění. *Transfúze a hematologie dnes*, 2012; roč. 18, č. 4, 154-161.

Neuwirtová R, Jonášová A, Čermák J. Analýza nemocných s myelodysplastickým syndromem (MDS) s delecí dlouhého ramene 5. chromosomu (del(5q)), sledovaných Českou MDS pracovní skupinou. Význam pro diagnostické zařazení a určení prognózy. *Transfúze hematol dnes* 2009; 15: 204-209.

Nimer SD. Myelodysplastic syndromes. *Blood*. 2008;111(10):4841-4851.

Nösslinger T, Tüchler H, Germing U, et al. Prognostic impact of age and gender in 897 untreated patients with primary myelodysplastic syndromes. *Ann Oncol*. 2010; 21: 120-125.

Papaemmanuil E, Gerstung M, Malcovati L, et al, Chronic Myeloid Disorders Working Group of the International Cancer Genome Consortium. Clinical and biological implications of driver mutations in myelodysplastic syndromes. *Blood*. 2013 Nov 21;122(22):3616-27.

Pellagatti A, Boultonwood J. The molecular pathogenesis of the myelodysplastic syndromes. *Eur J Haematol*. 2015 Jul;95(1):3-15.

Pellagatti A, Cazzola M, Giagounidis A, et al. Marked down-regulation of nucleophosmin-1 is associated with advanced del(5q) myelodysplastic syndrome. *Br J Haematol*. 2011 Oct;155(2):272-4.

Pellagatti A, Boultonwood J. The molecular pathogenesis of the myelodysplastic syndromes. *Eur J Haematol*. 2015;95(1):3-15.

Peter L. Greenberg, Eyal Attar, John M. Bennett, et al. Myelodysplastic Syndromes Clinical Practice Guidelines in Oncology. *J Natl Compr Canc Netw*. 2011; 9(1): 30–56.

Rao DN, Anuradha C, Vishnupriya S, et al. Association of an MDR1 gene (C3435T) polymorphism with acute leukemia in India. *Asian Pac J Cancer Prev* 2010, 11:1063–1066.

Recher C, Ysebaert L, Beyne-Rauzy O, et al. Expression of focal adhesion kinase in acute myeloid leukemia is associated with enhanced blast migration, increased cellularity, and poor prognosis. *Cancer Res*. 2004;64:3191-7.

Rivlin N, Brosh R, Oren M, et al. Mutations in the p53 tumor suppressor Gene important milestones at the various steps of tumorigenesis. *Genes Cancer*. 2011; 2: 466-474.

- Rossi D, Khiabani H, Spina V, et al. Clinical impact of small TP53 mutated subclones in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2014; 123: 2139-2147.
- Rücker FG, Sander S, Döhner K, et al. Molecular profiling reveals myeloid leukemia cell lines to be faithful model systems characterized by distinct genomic aberrations. *Leukemia*. 2006;20:994-1001.
- Ruggero D, Pandolfi PP. Does the ribosome translate cancer? *Nat Rev Cancer*. 2003; 3:179-92.
- Saez B, Walter MJ, Graubert TA. Splicing factor gene mutations in hematologic malignancies. *Blood*. 2017 Mar 9;129(10):1260-1269.
- Saft L, Karimi M, Ghaderi M, et al. p53 protein expression independently predicts outcome in patients with lower-risk myelodysplastic syndromes with del(5q). *Haematologica*. 2014 Jun;99(6):1041-9.
- Sallman DA, Komrokji R, List A, et al. 'TP53 mutation allele-burden and disease outcome in MDS/AML'. *Leukemia*. 2017 Mar;31(3):767-768.
- Sallman DA, Komrokji R, Vaupel C, et al. Impact of TP53 mutation variant allele frequency on phenotype and outcomes in myelodysplastic syndromes. *Leukemia*. 2016 Mar;30(3):666-73.
- Saumell S, Florensa L, Luño E, et al. Prognostic value of trisomy 8 as a single anomaly and the influence of additional cytogenetic aberrations in primary myelodysplastic syndromes. *Br J Haematol*. 2012 Nov;159(3):311-21.
- Sebaa A, Ades L, Baran-Marzack F, et al. Incidence of 17p deletions and TP53 mutation in myelodysplastic syndrome and acute myeloid leukemia with 5q deletion. *Genes Chromosom Cancer*. 2012;51(12):1086-1092.
- Shaffer, J. McGowan-Jordan, M. Schmid (eds); ISCN (2013): An International System for Human Cytogenetic Nomenclature, L.G. S. Karger, Basel, 2013.
- Shin A, Lee KM, Ahn B, et al. Genotype-phenotype relationship between DNA repair gene genetic polymorphisms and DNA repair capacity. *Asian Pac J Cancer Prev* 2008, 9:501–505.
- Schanz J, Tüchler H, Solé F, et al. New comprehensive cytogenetic scoring system for primary myelodysplastic syndromes (MDS) and oligoblastic acute myeloid leukemia after MDS derived from an international database merge. *J Clin Oncol*. 2012 Mar 10;30(8):820-9.
- Silverman LR, Demakos EP, Peterson BL, et al. Randomized controlled trial of azacitidine in patients with the myelodysplastic syndrome: a study of the cancer and leukemia group B. *J Clin Oncol*. 2002; 20:2429-40.
- Sperling AS, Gibson CJ, Ebert BL. The genetics of myelodysplastic syndrome: from clonal haematopoiesis to secondary leukaemia. *Nat Rev Cancer*. 2017;17(1):5-19.
- Sridhar K, Ross DT, Tibshirani R, et al. Relationship of differential gene expression profiles in CD34⁺ myelodysplastic syndrome marrow cells to disease subtype and progression. *Blood*. 2009;114(23):4847-4858.

- Steensma DP and Bennett JM. The myelodysplastic syndromes: diagnosis and treatment. *Mayo Clin Proc.* 2006; 81: 104–130.
- Steensma DP, Bejar R, Jaiswal S, et al., Clonal hematopoiesis of indeterminate potential and its distinction from myelodysplastic syndromes. *Blood.* 2015 Jul 2;126(1):9-16.
- Svobodova K, Zemanova Z, Lhotska H, et al. Copy number neutral loss of heterozygosity at 17p and homozygous mutations of TP53 are associated with complex chromosomal aberrations in patients newly diagnosed with myelodysplastic syndromes. *Leuk Res.* 2016 Mar;42:7-12.
- Swerdlow SH, Campo E, Harris NL et al. *WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues* (4th ed.) 2008;. International Agency for Research on Cancer.
- Valencia A, Masala E, Rossi A, et al. Expression of nucleoside-metabolizing enzymes in myelodysplastic syndromes and modulation of response to azacitidine. *Leukemia.* 2014; 28:621–8.
- Valent P, Horny HP, Bennett JM, et al. Definitions and standards in the diagnosis and treatment of the myelodysplastic syndromes: consensus statements and report from a working conference. *Leuk Res.* 2007; 31: 727–736
- Vasikova A, Belickova M, Budinska E, et al. A distinct expression of various gene subsets in CD34+ cells from patients with early and advanced myelodysplastic syndrome. *Leuk Res* 2010, 34:1566–1572.
- Volkert S, Kohlmann A, Schnittger S, et al. Association of the type of 5q loss with complex karyotype, clonal evolution, TP53 mutation status, and prognosis in acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndrome. *Genes Chromosomes Cancer.* 2014; 53: 402-410.
- Will B, Zhou L, Vogler TO, et al. Stem and progenitor cells in myelodysplastic syndromes show aberrant stage-specific expansion and harbor genetic and epigenetic alterations. *Blood.* 2012 Sep 6, 120(10): 2076-2086.
- Wong TN, Ramsingh G, Young AL, et al. The role of TP53 mutations in the origin and evolution of therapy-related AML. *Nature.* 2015; 518: 552-555.
- Zahid MF, Patnaik MM, Gangat N, et al. Insight into the molecular pathophysiology of myelodysplastic syndromes: targets for novel therapy. *Eur J Haematol.* 2016 Oct;97(4):313-20.
- Zeidan AM, Sekeres MA, Garcia-Manero G, et al. Comparison of risk stratification tools in predicting outcomes of patients with higher-risk myelodysplastic syndromes treated with azanucleosides. *Leukemia.* 2016; 30: 649-57.
- Zemanova Z, Michalova K, Jonasova A, et al. Involvement of deleted chromosome 5 in complex chromosomal aberrations in newly diagnosed myelodysplastic syndromes (MDS) is correlated with extremely adverse prognosis. *Leuk Res.* 2014 May;38(5):537-44.

PUBLIKACE AUTORA K TÉMATU DISERTACE

Publikace, které jsou podkladem disertace

Belickova M, Vesela J, Jonasova A, Vesela J, Votavova H, Merkerova MD, Zemanova Z, Brezinova J, Mikulenkova D, Lauermannova M, Valka J, Michalova K, Neuwirtova R, Cermak J. *TP53* mutation variant allele frequency is a potential predictor for clinical outcome of patients with lower-risk myelodysplastic syndromes. *Oncotarget*. 2016 Jun 14;7(24):36266-36279. **IF=5.168**

Belickova M, Merkerova MD, Stara E, Vesela J, Sponerova D, Mikulenkova D, Brdicka R, Neuwirtova R, Jonasova A, Cermak J. DNA repair gene variants are associated with an increased risk of myelodysplastic syndromes in a Czech population. *J Hematol Oncol*. 2013; 6:9. **IF=6.350**

Belickova M, Merkerova MD, Votavova H, Valka J, Vesela J, Vesela J, Hajkova H, Klema J, Cermak J, Jonasova A. Up-regulation of ribosomal genes is associated with a poor response to azacitidine in myelodysplasia and related neoplasms. *Int J Hematol*. 2016 Nov;104(5):566-573. **IF=1.610**

Ostatní publikace za dobu studia

Valka J, Vesela J, Votavova H, Dostalova-Merkerova M, Horakova Z, Campr V, Brezinova J, Zemanova Z, Jonasova A, Cermak J and **Belickova M**. Differential expression of homologous recombination DNA repair genes in the early and advanced stages of myelodysplastic syndrome. *European Journal of Haematology*. „Accepted“ **IF=2.653**

Krejčík Z, **Belickova M**, Hrustincova A, Votavova H, Cermak J, Jonasova A, and Dostalova Merkerova M. MicroRNA profiles as predictive markers of response to azacitidine therapy in myelodysplastic syndromes and acute myeloid leukemia. *Disease Markers*. „Under Review“ **IF=2.348**

Dostalova Merkerova M, Hrustincova A, Krejčík Z, Votavova H, Ratajova E, Cermak J, **Belickova M**. Microarray profiling defines circulating microRNAs associated with myelodysplastic syndromes. *Neoplasma*. 2017 May 9;64. **IF=1.871**

Svobodova K, Zemanova Z, Lhotska H, Novakova M, Podskalska L, **Belickova M**, Brezinova J, Sarova I, Izakova S, Lizcova L, Berkova A, Siskova M, Jonasova A, Cermak J, Michalova K. Copy number neutral loss of heterozygosity at 17p and homozygous mutations of TP53 are associated with complex chromosomal aberrations in patients newly diagnosed with myelodysplastic syndromes. *Leuk Res*. 2016;42:7-12. **IF=2.501**

Krejčík Z, **Beličková** M, Hruštinová A, Kléma J, Zemanová Z, Michalová K, Čermák J, Jonášová A, Dostálová Merkerová M. Aberrant expression of the microRNA cluster in 14q32 is associated with del(5q) myelodysplastic syndrome and lenalidomide treatment. *Cancer Genetics*. 2015;208(4):156-61. **IF=1.930**

Merkerova MD, Krejcik Z, **Belickova** M, Hrustincova A, Klema J, Stara E, Zemanova Z, Michalova K, Cermak J, Jonasova A. Genome-wide miRNA profiling in myelodysplastic syndrome with del(5q) treated with lenalidomide. *Eur J Haematol*. 2015 Jul;95(1):35-43. **IF=2.653**

Neuwirtova R, Fuchs O, Holicka M, Vostry M, Kostecka A, Hajkova H, Jonasova A, Cermak J, Cmejla R, Pospisilova D, **Belickova** M, Siskova M, Hochova I, Vondrakova J, Sponerova D, Kadlcikova E, Novakova L, Brezinova J, Michalova K. Transcription factors Flil and EKLF in the differentiation of megakaryocytic and erythroid progenitor in 5q-syndrome and in Diamond-Blackfan anemia. *Ann Hematol*. 2013;92(1):11-8. **IF=2.919**

Belickova M, Cermak J, Dostalova Merkerova M, Vesela J, Krejcik Z, Cechova E, Zemanova Z, Michalova K, Votavova H, Caniga M, Neuwirtova R, Jonasova A. Changes Associated With Lenalidomide Treatment in the Gene Expression Profiles of Patients With Del(5q). *Clin Lymphoma Myeloma Leuk*. 2012;12(5):375-83. **IF=2.494**

Curik N, Burda P, Vargova K, Pospisil V, **Belickova** M, Vlckova P, Savvulidi F, Necas E, Hajkova H, Haskovec C, Cermak J, Krivjanska M, Trneny M, Laslo P, Jonasova A, Stopka T. 5-Azacitidine in aggressive myelodysplastic syndromes regulates chromatin structure at PU.1 gene and cell differentiation capacity. *Leukemia*. 2012;26(8):1804-11. **IF=11.702**

Merkerova MD, Bystricka D, **Belickova** M, Krejcik Z, Zemanova Z, Polak J, Hajkova H, Brezinova J, Michalova K, Cermak J. From cryptic chromosomal lesions to pathologically relevant genes: integration of SNP-array with gene expression profiling in myelodysplastic syndrome with normal karyotype. *Genes Chromosomes Cancer*. 2012;51(5):419-28. **IF=3.696**

Cechova H, Lassuthova P, Novakova L, **Belickova** M, Stemberkova R, Jencik J, Stankova M, Hrabakova P, Pegova K, Zizkova H, Cermak J. Monitoring of methylation changes in 9p21 region in patients with myelodysplastic syndromes and acute myeloid leukemia. *Neoplasma*. 2012;59(2):168-74. **IF=1.871**

Votavova H, Grmanova M, Dostalova Merkerova M, **Belickova** M, Vasikova A, Neuwirtova R, Cermak J. Differential expression of microRNAs in CD34+ cells of 5q-syndrome. *J Hematol Oncol*. 2011; 6;4:1. **IF= IF=6.350**

Dostalova Merkerova M, Krejcik Z, Votavova H, **Belickova** M, Vasikova A, Cermak J. Distinctive microRNA expression profiles in CD34+ bone marrow cells from patients with myelodysplastic syndrome. *Eur J Hum Genet*. 2011 Mar;19(3):313-9. **IF=4.287**

Vasikova A, **Belickova** M, Budinska E, Cermak J. A distinct expression of various gene subsets in CD34+ cells from patients with early and advanced myelodysplastic syndrome. *Leuk Res.* 2010;34(12):1566-72. **IF=2.501**

Vasikova A, Budinska E, **Belickova** M, Cermak J, Bruchova H. Differential gene expression of bone marrow CD34+ cells in early and advanced myelodysplastic syndrome. *Neoplasma.* 2009;56(4):335-42. **IF=1.871**

Merkerova M, Vasikova A, **Belickova** M, Bruchova H. MicroRNA expression profiles in umbilical cord blood cell lineages. *Stem Cells Dev.* 2010 Jan;19(1):17-26. **IF=3.562**

Merkerova M, **Belickova** M, Bruchova. Differential expression of microRNAs in hematopoietic cell lineages. *H. Eur J Haematol.* 2008;81(4):304-10. **IF=2.598**

Veselovska J, Pospisilova D, Pekova S, Horvathova M, Solna R, Cmejlova J, Cmejla R, **Belickova** M, Mihal V, Sary J, Divoky. Most pediatric patients with essential thrombocythemia show hypersensitivity to erythropoietin in vitro, with rare JAK2 V617F-positive erythroid colonies. *V. Leuk Res.* 2008;32(3):369-77. **IF=2.501**

Cukrová V, Neuwirtová R, Dolezalová L, **Belicková** M, Bartůnková J, Jonášová A, Cermák J, Homolková H, Malíková I. Defective cytotoxicity of T lymphocytes in myelodysplastic syndrome. *Exp Hematol.* 2009 Mar;37(3):386-94. **IF=2.820**

Jonášová A, Červinek L, Bělohávková P, Čermák J, **Beličková** M, Rohoň P, Černá O, Hochová I, Šišková M, Kačmářová K, Janoušová E. Lenalidomide treatment in myelodysplastic syndrome with 5q deletion--Czech MDS group experience. *Vnitr Lek.* 2015 Dec;61(12):1028-33.

Hodnota IF byla určena ke 26.06.2017.